



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CÁSSIO CARMO DE OLIVEIRA

Bioconversão de farinha de penas e sangue de frango por *Aspergillus niger*: uma abordagem direcionada para a produção simultânea de enzimas e aumento da digestibilidade proteica

Bioconversion of Chicken Feather Meal by *Aspergillus niger*:
Simultaneous Enzymes Production and increase protein digestibility

CAMPINAS
2019

CÁSSIO CARMO DE OLIVEIRA

Bioconversão de farinha de penas e sangue de frango por *Aspergillus niger*: uma abordagem direcionada para a produção simultânea de enzimas e aumento da digestibilidade proteica

Bioconversion of Chicken Feather Meal by *Aspergillus niger*: Simultaneous Enzymes Production and increase protein digestibility

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Dissertation presented to the School of Food Engineering of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Food Science.

Orientador: Prof. Dr. RUANN JANSER SOARES DE CASTRO

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO CÁSSIO
CARMO DE OLIVEIRA E ORIENTADO
PELO PROF. DR. RUANN JANSER SOARES
DE CASTRO

CAMPINAS
2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

OL4b Oliveira, Cássio Carmo de, 1978-
Bioconversão de farinha de penas e sangue de frango por *Aspergillus niger* : uma abordagem direcionada para a produção simultânea de enzimas e aumento da digestibilidade proteica / Cássio Carmo de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Ruann Janser Soares de Castro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Farinha de penas. 2. *Aspergillus niger*. 3. Fermentação semissólida. 4. Hidrolases. I. Castro, Ruann Janser Soares de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Bioconversion of chicken feather meal by *Aspergillus niger* : simultaneous enzymes production and increase protein digestibility

Palavras-chave em inglês:

Feather meal

Aspergillus niger

Solid state fermentation

Hydrolases

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Ruann Janser Soares de Castro [Orientador]

Luciana Francisco Fleuri

Flavia Maria Netto

Data de defesa: 17-05-2019

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-4039-3529>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3467163093738648>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ruann Janser Soares de Castro – FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Luciana Francisco Fleuri – IBB/UNESP

Profa. Dra. Flavia Maria Netto – FEA/UNICAMP

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família
pelo apoio e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar força e me guiar em todos os momentos da minha vida.

Ao meu filho, Lucas, que é a motivação principal da minha vida e de tudo que faço.

À minha esposa, Priscila, por ser minha maior incentivadora e conselheira, sem a qual nada disso seria possível, por toda a paciência, todo apoio e toda persistência, mesmo nos momentos mais difíceis, nunca me deixando desistir.

À minha mãe e meu pai, Gecineida e Afonso, por todo esforço e dedicação para minha educação, sendo os responsáveis pelo início de toda essa caminhada.

Ao professor Ruann, pela ajuda, cobrança, atenção, paciência, preocupação, dedicação e por todo conhecimento compartilhado ao longo desses anos de muito aprendizado e crescimento.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA que por muitas vezes me ajudaram e tornaram esse desafio mais agradável.

A todos os professores e funcionários que fazem parte da FEA e de toda a UNICAMP pela competência e contribuição com valiosos conhecimentos repassados durante todos esses anos.

À empresa Ad'oro pela doação de material e flexibilização de horários para a condução deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora pela valorosa contribuição neste trabalho.

Ao Departamento de Ciência de Alimentos, à Faculdade de Engenharia de Alimentos e à Unicamp pela grande oportunidade de desenvolvimento, aprimoramento dos conhecimentos científicos e formação profissional.

À CAPES, pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a utilização de farinha de penas de frango como substrato semissólido para produção simultânea das enzimas protease, lipase, fitase e queratinase utilizando o fungo filamentoso *Aspergillus niger* LBA02 como agente de fermentação. Adicionalmente, a obtenção de uma farinha fermentada com maior digestibilidade proteica foi definida como meta. A técnica de delineamento experimental (DCCR) foi utilizada para avaliar as condições mais adequadas de cultivo incluindo a temperatura de incubação, umidade inicial do substrato e suplementação da farinha de penas com farelo de trigo para produção simultânea das enzimas. Os maiores valores de produção enzimática foram detectados após 48 h de fermentação na região dos pontos centrais do DCCR, onde a umidade inicial foi de 50%, a temperatura de 30°C e o farelo de trigo incorporado foi de 15% m/m. Nestas condições, o *A. niger* LBA02 atingiu produções de aproximadamente 300 U/g para protease, 100 U/g para lipase, 80 U/g para fitase e 10 U/g para queratinase. As variáveis independentes temperatura e umidade inicial foram as que apresentaram os efeitos mais destacáveis na produção das enzimas, e embora a adição de farelo de trigo tenha apresentado impacto positivo e significativo ($p \leq 0,10$) somente na produção de fitase, a incorporação deste como suplementação para a farinha de penas permitiu antecipar o pico de produção das enzimas de 72h para 48h, o que representa ganhos significativos em termos de produtividade. Além disso, a utilização de farelo de trigo como suplemento resultou em valores superiores de atividade enzimática comparados aos encontrados na fermentação inicial realizada apenas com a farinha de penas, a saber: ganhos de 20, 25 e 300% na produção de protease, lipase e fitase, respectivamente. O extrato enzimático bruto foi concentrado e caracterizado bioquimicamente quanto aos parâmetros pH e temperatura para máxima atividade enzimática. As proteases apresentaram maior atividade em pH 5,5 e temperatura de 50°C e as lipases apresentaram maior atividade em valores de pH entre 2,0 e 3,0 e temperaturas entre 50 e 60°C. Nos ensaios envolvendo as enzimas fitase e queratinase, os modelos não apresentaram bons ajustes estatísticos; ainda assim foi possível detectar um valor máximo de atividade de fitase em pH 3,0 e temperatura 60,6°C e maiores valores de atividade de queratinase nos ensaios realizados em pH 3,0 e 8,0 e na temperatura de 60,6°C. As análises de proteína antes e após a fermentação semissólida não apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,10$), havendo um aumento na média de proteína bruta do meio de 44,7% para 50,7%, e ao contrário do que se esperava, a digestibilidade proteica em pepsina da farinha fermentada apresentou uma redução na média de

50,3% para 41,4%. Considerando o nível de produção das enzimas, sugere-se um trabalho futuro com adição da farinha fermentada na ração de frangos para investigar os benefícios no desempenho de crescimento das aves. Um estudo mais adequado de digestibilidade relacionando os resultados *in vitro* com experimentos conduzidos *in vivo* seria também uma alternativa interessante para melhor aproveitamento da farinha de penas na alimentação animal.

Palavras-chave: farinha de penas e sangue; *Aspergillus niger*; fermentação semissólida; enzimas hidrolíticas.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the simultaneous production of protease, lipase, phytase and keratinase enzymes by *Aspergillus niger* LBA02 under solid state fermentation using chicken feather meal as substrate. Other objective was to produce a fermented meal with higher protein digestibility. A central composite rotatable design (CCRD) was used to study the effect of some culture parameters for production of enzymes: incubation temperature, initial moisture of the culture medium and substrate supplementation with wheat bran. The highest results obtained of enzymes production were detected after 48 h of fermentation in the central points of the CCRD using an initial moisture of 50%, 30°C as incubation temperature and supplementation of the feather meal with 15% wheat bran. Under these conditions, the *A. niger* LBA02 yields of protease (300 U/g), lipase (100 U/g), phytase (80 U/g) and keratinase (10 U/g). The independent variables incubation temperature and initial moisture of the culture medium presented as highly significant on the enzymes production. The supplementation with wheat bran had a significant impact ($p \leq 0.10$) only on phytase production, but it anticipates the production in the most of the enzymes from 72h to 48h, which represents gains in terms of productivity. Also resulted in gains of 20, 25 and 300% in values of protease, lipase and phytase activities respectively compared to the fermentation with just feather meal as substrate. The enzymatic extract was concentrated to study the pH and temperature parameters for maximum enzymatic activity. The protease activity was higher at pH 5.5 and temperature of 50°C and lipase activity showed higher at pH values between 2.0 and 3.0 and temperatures between 50 and 60.6°C. No significant effects of the pH and temperature on phytase and keratinase production were observed. The higher values of phytase activity was at pH 3.0 and temperature of 60°C and keratinase activity was at pH 3.0 and 8.0 and at 60.6°C. The digestibility of feather meal and fermented meal didn't show a significant difference ($p \leq 0.10$), there was an increase of protein from 44.7% to 50.7%, and a decrease of the pepsin digestibility from 50.3% to 41.4%. The values of enzymes production suggest a future work with addition of this fermented feather meal in broiler feed to investigate the benefits in the growth performance. Another digestibility study relating the results obtained in vitro with experiments conducted in vivo would also be an interesting alternative for the better use of feather meal in animal feed.

Keywords: feather meal; *Aspergillus niger*; solid state fermentation; hydrolytic enzymes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura do ácido fítico em pH ácido, elucidando o encontrado no proventrículo e moela de aves (Adaptado de Coulibaly et al., 2011).	25
Figura 2. Estrutura do ácido fítico em pH básico, elucidando o encontrado a partir do duodeno em aves (Adaptado de Coulibaly et al., 2011).	25
Figura 3. Produção de protease (▲), lipase (■) e fitase (●) por <i>A. niger</i> LBA02 em diferentes tempos de fermentação semissólida utilizando farinha de penas como único substrato.	40
Figura 4. Curvas de contorno para a produção de protease (U/g) por <i>A. niger</i> LBA02 após 48h de fermentação semissólida utilizando farinha de penas e sangue como substrato em função das variáveis independentes umidade inicial do meio de cultivo, temperatura de incubação e suplementação do meio com farelo de trigo.	43
Figura 5. Curvas de contorno para a produção de lipase (U/g) por <i>A. niger</i> LBA02 após 48h de fermentação sólida utilizando farinha de penas como substrato em função das variáveis independentes umidade inicial do meio de cultivo, temperatura de incubação e suplementação do meio com farelo de trigo.	47
Figura 6. Curvas de contorno para a produção de fitase (U/g) por <i>A. niger</i> LBA02 após 72h de fermentação sólida utilizando farinha de penas como substrato em função das variáveis independentes umidade inicial do meio de cultivo, temperatura de incubação e suplementação do meio com farelo de trigo.	51
Figura 7. Produção de protease (▲), lipase (■), fitase (●) e queratinase (◆) por <i>A. niger</i> LBA02 durante cinética de fermentação de 96h utilizando farinha de penas e sangue suplementada com farelo de trigo nas condições selecionadas como mais adequadas no DCCR.	54
Figura 8. Curva de contorno para atividade de protease (U/g) do extrato enzimático concentrado de <i>A. niger</i> LBA02 obtido em fermentação semissólida de farinha de penas.	56
Figura 9. Curva de contorno para atividade de lipase (U/g) do extrato enzimático concentrado de <i>A. niger</i> LBA02 obtido em fermentação semissólida.	58
Figura 10. Comparativo dos resultados de proteína bruta (%) e digestibilidade de proteína em pepsina 0,02% (%) entre o meio de cultivo de farinha de penas e farelo de trigo e o mesmo meio após 48h de fermentação por <i>A. niger</i> LBA02.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da farinha de pena e sangue (FPS).....	20
Tabela 2. Composição e teores de aminoácidos totais (AAt) e aminoácidos digestíveis verdadeiros (AAd) da farinha de pena e sangue (FPS), em porcentagem de matéria natural. .	21
Tabela 3. Principais grupos de enzimas utilizadas na ração de aves e respectivos efeitos sobre o produto final.	24
Tabela 4. Variáveis independentes e níveis do planejamento experimental DCCR para determinação das condições de cultivo de <i>A. niger</i> LBA02 em farinha de penas e sangue e produção simultânea de enzimas hidrolíticas.	34
Tabela 5. Matriz do DCCR para o estudo dos efeitos das variáveis independentes umidade, temperatura de incubação e adição de farelo de trigo sobre a produção simultânea de enzimas hidrolíticas por <i>A. niger</i> LBA02 utilizando farinha de penas e sangue como substrato semissólido.	34
Tabela 6. Variáveis independentes e níveis codificados do DCCR para determinação do pH e temperatura para máxima atividade das enzimas de <i>A. niger</i> LBA02.....	36
Tabela 7. Matriz do DCCR para o estudo dos efeitos das variáveis independentes pH e temperatura sobre a atividade das enzimas protease, lipase, fitase e queratinase produzidas por <i>A. niger</i> LBA02 utilizando farinha de penas e sangue como substrato semissólido.	36
Tabela 8. Matriz do DCCR 2 ³ contendo ensaios e respostas para cultivo semissólido de <i>A. niger</i> LBA02 utilizando farinha de penas e sangue como substrato para a produção de protease durante 48, 72 e 96 h de fermentação.	42
Tabela 9. Coeficientes de regressão do DCCR 2 ³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de <i>A. niger</i> LBA02 e produção de protease após 48h de fermentação semissólida utilizando farinha de penas e sangue como substrato.	42
Tabela 10. ANOVA para determinação das condições mais adequadas de cultivo de <i>A. niger</i> LBA02 e produção de protease após 48h de fermentação semissólida utilizando farinha de penas e sangue como substrato.	43
Tabela 11. Matriz do DCCR 2 ³ contendo ensaios e respostas para cultivo semissólido de <i>A. niger</i> LBA02 utilizando farinha de penas e sangue como substrato para produção de lipase durante 48, 72 e 96h de fermentação.	46

Tabela 12. Coeficientes de regressão do DCCR 2 ³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de <i>A. niger</i> LBA02 e produção de lipase após 48h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.	46
Tabela 13. ANOVA para determinação das condições mais adequadas de cultivo de <i>A. niger</i> LBA02 e produção de lipase após 48h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.	47
Tabela 14. Matriz do DCCR 2 ³ contendo ensaios e respostas para cultivo semissólido de <i>A. niger</i> LBA02 utilizando farinha de penas e sangue como substrato e produção de fitase durante 48, 72 e 96h de fermentação.	49
Tabela 15. Coeficientes de regressão do DCCR 2 ³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de <i>A. niger</i> LBA02 e produção de fitase após 72h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.	50
Tabela 16. ANOVA para determinação das condições mais adequadas de cultivo de <i>A. niger</i> LBA02 e produção de fitase após 72h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.	50
Tabela 17. Matriz do DCCR 2 ³ contendo ensaios e respostas para cultivo semissólido de <i>A. niger</i> LBA02 utilizando farinha de penas e sangue como substrato e produção de queratinase durante 48, 72 e 96h de fermentação.	53
Tabela 18. Matriz do DCCR 2 ² contendo os níveis das variáveis independentes e respectivas respostas para atividade de protease do extrato enzimático concentrado de <i>A. niger</i> LBA02 em função da combinação dos parâmetros pH e temperatura.	55
Tabela 19. Coeficientes de regressão do DCCR 2 ² para determinação das condições de pH e temperatura para atividade de protease do extrato enzimático concentrado de <i>A. niger</i> LBA02.	55
Tabela 20. ANOVA para o DCCR no estudo de determinação das condições mais adequadas de atividade de protease do extrato enzimático concentrado de <i>A. niger</i> LBA02.	56
Tabela 21. Matriz do DCCR 2 ² contendo os níveis das variáveis independentes e respectivas respostas para atividade de lipase do extrato enzimático concentrado de <i>A. niger</i> LBA02 em função da combinação dos parâmetros pH e temperatura.	57
Tabela 22. Coeficientes de regressão do DCCR 2 ² para determinação das condições de pH e temperatura para atividade de lipase do extrato enzimático concentrado de <i>A. niger</i> LBA02.	57

Tabela 23. ANOVA para o DCCR no estudo de determinação das condições mais adequadas de atividade de lipase do extrato enzimático concentrado de <i>A. niger</i> LBA02.....	58
Tabela 24. Matriz do DCCR 2 ² contendo os níveis das variáveis independentes e respectivas respostas para atividade de fitase do extrato enzimático concentrado de <i>A. niger</i> LBA02 em função da combinação dos parâmetros pH e temperatura.	59
Tabela 25. Coeficientes de regressão do DCCR 2 ² para determinação das condições de pH e temperatura para atividade de fitase do extrato enzimático concentrado de <i>A. niger</i> LBA02.	59
Tabela 26. Matriz do DCCR 2 ² contendo os níveis das variáveis independentes e respectivas respostas para atividade de queratinase do extrato enzimático concentrado de <i>A. niger</i> LBA02 em função da combinação dos parâmetros pH e temperatura.	61
Tabela 27. Coeficientes de regressão do DCCR 2 ² para determinação das condições de pH e temperatura para atividade de queratinase do extrato enzimático concentrado de <i>A. niger</i> LBA02.	61
Tabela 28. Coeficientes de regressão do DCCR 2 ³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de <i>A. niger</i> LBA02 e produção de protease após 72h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.	80
Tabela 29. Coeficientes de regressão do DCCR 2 ³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de <i>A. niger</i> LBA02 e produção de protease após 96h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.	80
Tabela 30. Coeficientes de regressão do DCCR 2 ³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de <i>A. niger</i> LBA02 e produção de lipase após 72h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.	81
Tabela 31. Coeficientes de regressão do DCCR 2 ³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de <i>A. niger</i> LBA02 e produção de lipase após 96h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.	81
Tabela 32. Coeficientes de regressão do DCCR 2 ³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de <i>A. niger</i> LBA02 e produção de fitase após 48h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.	82
Tabela 33. Coeficientes de regressão do DCCR 2 ³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de <i>A. niger</i> LBA02 e produção de fitase após 96h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.	82

Tabela 34. Coeficientes de regressão do DCCR 2 ³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de <i>A. niger</i> LBA02 e produção de queratinase após 48h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.....	83
Tabela 35. Coeficientes de regressão do DCCR 2 ³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de <i>A. niger</i> LBA02 e produção de queratinase após 72h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.....	83
Tabela 36. Coeficientes de regressão do DCCR 2 ³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de <i>A. niger</i> LBA02 e produção de protease após 96h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.	84

SUMÁRIO

1. Introdução	17
2. Objetivos.....	19
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos	19
3. Revisão Bibliográfica.....	20
3.1. Farinha de Penas e Sangue (FPS) de frango	20
3.2. Enzimas em rações de frango	23
3.2.1. Fitases	24
3.2.2. Proteases	26
3.2.3. Queratinases	27
3.2.4. Lipases	28
3.3. <i>Aspergillus niger</i> e sua relação com a produção de ingredientes para rações animais	29
4. Material e Métodos	33
4.1. Micro-organismo	33
4.2. Produção do pré-inóculo para fermentação.....	33
4.3. Produção de enzimas hidrolíticas em fermentação semissólida utilizando a técnica de planejamento experimental	33
4.4. Validação experimental dos modelos estatísticos e cinética de produção enzimática	35
4.5. Concentração dos extratos enzimáticos	35
4.6. Determinação das condições de pH e temperatura para máxima atividade das enzimas protease, lipase e fitase de <i>A. niger</i> LBA02 por planejamento experimental.....	35
4.7. Determinação da atividade das enzimas hidrolíticas	36
4.7.1. Determinação da atividade de protease	37
4.7.2. Determinação da atividade de lipase	37

4.7.3. Determinação da atividade de fitase	37
4.7.4. Determinação da atividade de queratinase	38
4.8. Análise de digestibilidade de proteína em pepsina 0,02%	38
4.9. Análises estatísticas.....	39
5. Resultados e Discussão	40
5.1. Fermentação da farinha de penas	40
5.2. Estudo dos parâmetros de processo sobre a produção das enzimas	41
5.2.1. Produção de Protease.....	41
5.2.2. Produção de Lipase	45
5.2.3. Produção de Fitase.....	49
5.2.4. Produção de Queratinase	52
5.3. Cinética de produção das enzimas hidrolíticas	53
5.4. Determinação das condições de pH e temperatura para máxima atividade das enzimas	54
5.4.1. Atividade de protease	54
5.4.2. Atividade de lipase	57
5.4.3. Atividade de fitase	59
5.4.4. Atividade de queratinase	60
5.5. Digestibilidade da farinha de pena.....	62
6. Conclusão	65
Perspectivas de trabalhos futuros	66
Referências Bibliográficas	67
ANEXO A.....	80
ANEXO B	81
ANEXO C.....	82
ANEXO D.....	83

1. Introdução

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne de frango com uma produção de 12,9 milhões de toneladas em 2016, e com um crescimento médio de 0,34 milhões de toneladas por ano na última década (2006 a 2016), conforme o relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal – (ABPA, 2016).

A indústria da carne de frango também produz uma grande quantidade de resíduos, tais como vísceras, ossos, penas e sangue, que juntos podem chegar até 28% do peso vivo do frango, sendo de 9 a 12% referentes a penas e sangue, segundo a Associação Brasileira de Reciclagem Animal – (ABRA, 2016).

Atualmente, o destino quase exclusivo desses resíduos é a produção de farinhas por meio de cozimento sob pressão para uso na alimentação animal. No período de 2010-2014, foram produzidas em média 528 mil toneladas de farinha de penas por ano (ABRA, 2016).

Além de evitar a poluição ambiental, a utilização de farinhas de origem animal como fonte alternativa de proteína e fósforo para rações reduz os custos da dieta, uma vez que esses produtos substituem parcial ou totalmente alguns ingredientes de custo expressivo, como farelo de soja e o fosfato bicálcico (Scheuermann et al., 2007). Desta forma, toda possível diminuição dos custos com a nutrição das aves pode ser muito vantajosa, uma vez que a alimentação representa aproximadamente 70% dos custos totais de produção (Matias et al., 2015).

Embora a farinha de penas contenha alto teor de proteína bruta e represente uma boa matéria-prima para formulação de rações, ela não é totalmente aproveitada pelas aves devido à sua baixa digestibilidade. Uma alternativa bastante difundida para a melhoria da digestibilidade é a utilização de enzimas associadas ao processo convencional de produção da farinha de pena (Pacheco et al., 2016).

Outras alternativas bastante estudadas para o aumento da digestibilidade, bem como a substituição do processo convencional de cozimento sob pressão, são a utilização de hidrólise enzimática das penas com enzimas queratinolíticas e a degradação das penas por micro-organismos, muitas delas com possibilidade inclusive de ganhos nos custos energéticos (Brandelli et al., 2015).

A adição de enzimas exógenas nas rações também tem sido alternativa para melhorar a eficiência de utilização de alimentos tradicionais e viabilizar o uso de matérias-primas alternativas, como as farinhas de origem animal (Matias et al., 2015).

Existe uma gama de enzimas exógenas disponíveis no mercado de aditivos, as quais podem ser adicionadas individualmente na ração ou combinadas na forma de complexos e “blends”. As principais enzimas deste grupo, incluem: fitases, proteases, amilases, celulasas, xilanases, galactosidases, glucanases, pectinases e lipases (Carvalho, 2013).

As enzimas exógenas utilizadas nas rações avícolas são produzidas industrialmente em laboratórios especializados por meio de culturas aeróbicas, sendo derivadas principalmente da fermentação bacteriana, fúngica e de leveduras destacando-se bactérias do gênero *Bacillus* e fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* como principais produtores (Dessimoni, 2011).

Estudos também têm demonstrado que a utilização de ingredientes fermentados em rações contribui para o incremento da saúde e eficiência intestinal de aves, promovendo aumento das vilosidades intestinais, melhoria na absorção de nutrientes, redução do pH do intestino, diminuição na proliferação de coliformes e patógenos, aumento do ganho de peso e redução da gordura abdominal (Engberg et al., 2009; Niba et al., 2009; Naji et al., 2015). Atualmente, o fungo filamentoso *Aspergillus niger* é um dos principais micro-organismos probióticos aplicados em frangos de corte (Chen et al., 2009; Saleh et al., 2011; Zhang et al., 2015).

As fermentações para produção de enzimas podem ser tanto por processo submerso, quanto por fermentação semissólida (FSS). No caso de cultivo de fungos filamentosos, a FSS apresenta diversas vantagens em relação à fermentação submersa, como: condições de cultivo mais parecidas com o habitat natural dos fungos, facilitando o crescimento e a secreção de enzimas, menores custos e maior concentração dos produtos após a extração (Pandey, 2003).

Neste contexto, o presente trabalho visou estudar a fermentação semissólida utilizando farinha de penas e sangue como substrato e uma linhagem de *Aspergillus niger* como agente de fermentação. O objetivo geral envolveu o estudo dos parâmetros de cultivo do micro-organismo para produção simultânea das enzimas protease, lipase, fitase e queratinase assim como a obtenção de um produto fermentado com maior digestibilidade proteica em relação à farinha não fermentada. O trabalho também contemplou a caracterização bioquímica das enzimas produzidas em função dos parâmetros pH e temperatura para máxima atividade.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a viabilidade de utilização de farinha de penas e sangue de frango como substrato semissólido para produção simultânea de enzimas hidrolíticas utilizando uma linhagem de *Aspergillus niger*.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos envolveram os tópicos apresentados a seguir:

- Avaliar a produção das enzimas hidrolíticas protease, lipase, fitase e queratinase pela linhagem de *Aspergillus niger* LBA02 utilizando a farinha de penas e sangue de frango como substrato;
- Estudar os parâmetros de cultivo mais adequados para produção simultânea das enzimas hidrolíticas utilizando a técnica de delineamento experimental;
- Caracterizar bioquimicamente as enzimas produzidas em função dos parâmetros pH e temperatura para máxima atividade;
- Avaliar a digestibilidade proteica do produto final fermentado em comparação à digestibilidade da farinha de penas e sangue não fermentada;
- Obter um produto fermentado com melhores características nutricionais no sentido de aproveitar a grande quantidade de resíduos produzida assim como promover ganhos financeiros na cadeia de produção de carne de frango.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Farinha de Penas e Sangue (FPS) de frango

A farinha de penas é obtida por cocção sob pressão, de penas limpas e não-decompostas, permitindo-se a presença de sangue, desde que a porcentagem incluída não altere significativamente a composição química da farinha (Eyng et al., 2012).

As penas contêm alto teor de proteína bruta, mas a maior parte dessa proteína (85 a 90%) é queratina, que, em virtude da sua estrutura fibrosa e da grande quantidade de aminoácidos sulfurosos, possui baixa solubilidade e alta resistência à ação de enzimas digestivas, devendo então ser hidrolisada, a fim de ser metabolizada por animais. O sangue, por sua vez, além de apresentar alto conteúdo proteico, é rico em lisina, aminoácido limitante em rações para aves (Scapim et al., 2003).

A falta de uniformidade e a baixa digestibilidade das farinhas de pena e sangue existentes no mercado se constitui em desafio para os nutricionistas, pois subprodutos de origem animal possuem padrão de aminoácidos bastante adequado às necessidades das aves. A caracterização desses subprodutos e resíduos contribui para diminuir a variabilidade de informações encontrada em diferentes tabelas nutricionais (Rostagno et al., 2005; Eyng et al., 2012).

Nas Tabelas 1 e 2 encontram-se os valores de composição da amostra de farinha de pena e sangue utilizadas nos trabalhos obtidos no laboratório interno da empresa Ad'oro que forneceu o material para o desenvolvimento desta pesquisa, comparados a alguns resultados reportados por Scapim et al. (2003) na avaliação de 4 diferentes fornecedores de farinha de penas e sangue.

Tabela 1. Composição da farinha de pena e sangue (FPS).

Composição	FPS Ad'oro	FPS Empresa 1	FPS Empresa 2	FPS Empresa 3	FPS Empresa 4
Matéria Seca (%)	94,15	90,35	85,05	93,53	93,55
Proteína Bruta (%)	84,66	81,23	71,20	82,25	82,40
Extrato Etéreo (%)	6,26	4,46	4,07	6,19	5,91
Matéria mineral (%)	1,91	3,38	3,62	1,80	1,83
Cálcio (%)	0,26	0,84	0,67	0,31	0,32
Fósforo (%)	0,22	0,48	0,48	0,23	0,21

Tabela 2. Composição e teores de aminoácidos totais (AAt) e aminoácidos digestíveis verdadeiros (AAd) da farinha de pena e sangue (FPS), em porcentagem de matéria natural.

Aminoácidos	FPS Ad'oro		FPS Empresa 1		FPS Empresa 2		FPS Empresa 3		FPS Empresa 4	
	AAt	AAd	AAt	AAd	AAt	AAd	AAt	AAd	AAt	AAd
Lisina	2,14	1,41	2,84	1,95	2,70	1,84	2,07	1,52	2,03	1,46
Metionina	0,56	0,42	0,62	0,47	0,71	0,53	0,62	0,48	0,64	0,49
AA Sulfurosos	3,80	2,39	3,62	2,21	3,69	2,00	5,28	3,61	5,17	3,35
Treonina	3,47	2,50	3,93	2,74	3,84	2,67	4,00	2,98	3,92	2,91
Arginina	4,87	4,01	5,68	4,81	5,01	4,30	5,89	5,16	5,80	5,01
Histidina	0,98	0,73	1,42	1,02	1,18	0,78	0,80	0,59	0,79	0,59
Valina	5,32	4,22	6,06	4,66	5,56	4,23	6,22	5,12	6,07	5,01
Isoleucina	3,49	2,79	3,43	2,79	3,63	2,91	4,02	3,43	4,05	3,48
Leucina	6,22	4,79	7,28	5,74	6,68	5,17	6,87	5,64	6,84	5,63
Fenilalanina	3,67	3,03	4,12	3,38	3,94	3,18	4,05	3,46	4,01	3,43

A qualidade e a digestibilidade da proteína dessas farinhas dependem basicamente da pressão, temperatura e do tempo de cozimento e secagem no processo de obtenção (Eyng et al., 2012).

Scapim et al. (2003) citaram vários trabalhos que utilizaram diferentes métodos de processamento com o intuito de definir os parâmetros ótimos para produção de farinhas de penas e farinhas de sangue e, conseqüentemente, o efeito desses processos sobre o valor nutritivo das farinhas produzidas. De acordo com estes autores, elevadas temperaturas e pressões por longos períodos são necessárias para obtenção de índices satisfatórios de hidrólise das proteínas das penas.

Davis et al. (1961) apresentaram de forma bastante clara a influência da pressão e do tempo de cozimento na digestibilidade da farinha de penas e demonstraram que a uma determinada pressão e com o aumento do tempo de cocção, aumenta-se a hidrólise da queratina e da digestibilidade da farinha. Porém, a digestibilidade aumenta de forma rápida até próximo de 60%, e a partir daí, são necessários tempos muito longos (e inviáveis economicamente) para atingir digestibilidade superior a 70%. Por outro lado, quanto maior a pressão, menor é o tempo necessário para atingir o mesmo nível de digestibilidade.

Embora o aumento do tempo e/ou da pressão de processamento possa melhorar a digestibilidade da proteína por pepsina, a termosensibilidade de alguns aminoácidos pode afetar negativamente o valor nutricional do produto final (Scapim et al., 2003). Por isso, a relação dos resultados de digestibilidade *in vitro* podem não ser confirmados com os resultados *in vivo*. (Eaksuree et al., 2016)

Uma alternativa para o aumento da digestibilidade da farinha de penas e sangue sem o aumento do tempo e/ou da pressão de processamento seria a utilização de processos enzimáticos e/ou processos fermentativos com o uso de enzimas exógenas e micro-organismos, respectivamente.

A adição de enzimas exógenas durante o processo de cozimento, associada ao processamento de baixa temperatura e baixa pressão, tem sido uma das alternativas utilizadas para mitigar os efeitos do superaquecimento da farinha de penas, melhorando a qualidade do produto e economizando energia (Pedersen et al., 2012, Pacheco et al., 2016).

Pacheco et al. (2016) compararam a digestibilidade *in vivo* de rações para cachorros adicionadas de farinha de penas produzidas pelos processos convencional e com adição de enzimas. O processo convencional foi conduzido da seguinte forma: 2,200 kg de penas adicionados de 1,600 kg de sangue submetidos ao cozimento a 110°C por 20 min, hidrólise a 300 kPa a 160°C por 40 min e posterior secagem por 75 min. A farinha de penas produzida com adição de enzimas foi obtida com os seguintes parâmetros: 2,200 kg de penas adicionados de 1,600 kg de sangue, 1,9 kg da enzima Allzyme FD®, 9,5 kg de metabisulfito de sódio e cozimento a 110°C por 40 min, hidrólise a 200 kPa a 160°C por 40 min e secagem por 75 min. Os autores constataram que a adição da enzima no processo de produção da farinha mesmo utilizando uma pressão inferior proporcionou um aumento de sua digestibilidade aparente no trato digestivo de 0,640 para 0,774 e também aumentou a energia metabolizável da ração em 600 Kcal/kg de matéria seca.

Shih (1999) estudou a adição de outra enzima comercial, a Alcalase® 2.5 L PF da empresa Novozymes na proporção de 0,8 kg de enzima / tonelada de matéria prima, para pré-tratamento das penas antes do cozimento e também para hidrólise durante o cozimento. O trabalho concluiu que a enzima aumentou a digestibilidade da proteína de 55% (processo convencional de cozimento sob pressão) para 65-72% quando a enzima foi adicionada durante o período de cozimento e para 82% quando feita uma hidrólise enzimática antes do cozimento. As condições de cozimento mais suaves possibilitadas pelo pré-tratamento enzimático geraram menos oxidação dos ácidos graxos e dos aminoácidos, e resultou em uma farinha com menos odor e cor mais clara comparada ao processo não enzimático (Shih, 1999).

Outras alternativas bastante investigadas são a hidrólise enzimática das penas por enzimas queratinolíticas ou a degradação das penas por micro-organismos produtores de queratinase durante processo fermentativo como uma alternativa de tratamento das penas cruas. Esses processos mostraram-se viáveis em relação à hidrólise alcalina e cozimento sob pressão

de vapor de penas, resultando muitas vezes em produtos de melhores propriedades nutricionais para aplicação como ração animal (Gupta & Ramnani, 2006; Cao et al., 2008; Brandelli et al., 2010; Brandelli et al., 2015).

Diversas pesquisas indicaram que as bactérias do gênero *Bacillus* são fontes importantes de enzimas queratinolíticas para processamento de penas, como: *Bacillus cereus* (Bhari et al, 2018), *Bacillus sp.* (Oliveira et al., 2016; Lemes et al., 2016), *Bacillus subtilis* (Sekar et al., 2016), *Bacillus amyloliquefaciens* (Bose et al. 2014), *Bacillus subtilis* (Sivakumar & Raveendran, 2015), *Bacillus halodurans* (Prakash et al., 2010), *Bacillus megaterium* (Park & Son, 2009). No entanto, existem também relatos de outros micro-organismos com capacidade semelhante de produção de queratinases e portanto, com grande potencial para processamento das penas de aves, a saber: *Chryseobacterium sp* (Fontoura et al., 2014), *Aspergillus niger* (Lopes et al., 2011; Mazotto et al., 2013), *Coprinopsis sp* (Al-Musallam et al., 2013), *Aspergillus carbonarius* (Sales et al., 2008), *Vibrio sp.* (Grazziotin et al., 2007) e *Kocuria rosea* (Bertsch, 2005).

3.2. Enzimas em rações de frango

Os nutricionistas têm se empenhado em buscar soluções para atender às exigências nutricionais das aves, que, devido ao rápido crescimento e à consequente redução no tempo de abate, passaram a exigir alimentos de melhor qualidade.

O uso de enzimas exógenas não é essencial na composição da dieta, sendo apenas uma estratégia para potencializar o desempenho dos animais, buscando uma melhoria na eficiência de utilização de alimentos tradicionais e/ou matérias-primas alternativas, como as farinhas de origem animal.

A aplicação de enzimas em dietas de aves para o aumento da disponibilidade de nutrientes é relatada desde 1926. Inicialmente, as pesquisas sobre enzimas na nutrição de aves concentravam-se em enzimas que degradam polissacarídeos não amiláceos, especialmente xilanase e β -glucanase, em dietas contendo trigo, centeio e cevada (Choct, 2006).

Posteriormente, um interesse considerável foi demonstrado no uso de fitase como aditivo alimentar, pois não apenas aumenta a disponibilidade de fosfato na ração, mas também reduz a poluição ambiental (Pariza & Cook, 2010).

Vários outros produtos enzimáticos estão sendo avaliados na indústria de rações, incluindo proteases para melhorar a digestão de proteínas, lipases para aumentar a digestão

lipídica, β -galactosidases para neutralizar alguns fatores antinutricionais em alimentos não-cerealíferos, amilase para auxiliar na digestão de amido e celulase para auxiliar a digestão de fibras (Marquardt, 1996; Adebisi et al., 2010; Munir & Maqsood, 2013).

Atualmente, existem diversas preparações enzimáticas comerciais disponíveis no mercado de aditivos (Tabela 3). As principais são as proteases, amilases, celulasas, xilanases, galactosidases, glucanases, pectinases, lipases e fitases.

O uso de enzimas exógenas na ração de animais monogástricos vem promovendo importantes benefícios nos sistemas de produção animal. Aves não conseguem aproveitar cerca de 15 a 25% dos valores nutricionais dos alimentos (Bedford & Partridge, 2011), seja por não produzirem enzimas em quantidade suficiente ou pela presença de fatores antinutricionais. Essa ineficiência na utilização dos nutrientes representa uma grande perda nos sistemas produtivos, visto que a nutrição é o maior constituinte do custo de produção, e esta perda pode ser minimizada com a adição de enzimas às rações.

Tabela 3. Principais grupos de enzimas utilizadas na ração de aves e respectivos efeitos sobre o produto final.

Enzima	Substrato	Ação
Xilanase	Arabinoxilanos	Redução da viscosidade da ração
Glucanases	β -glucanos	Redução da viscosidade da ração e menor umidade da cama
Pectinases	Pectinas	Redução da viscosidade da ração
Celulasas	Celulose	Degradação de celulose e liberação de nutrientes
Proteases	Proteínas	Suplementação das enzimas endógenas: degradação mais eficiente de proteínas
Amilases	Amido	Suplementação das enzimas endógenas: degradação mais eficiente do amido
Fitase	Ácido Fítico	Melhora a utilização do fósforo proveniente dos vegetais. Remoção do Ácido Fítico
Galactosidases	Galactosídeos	Remoção de galactosídeos
Lipases	Lipídeos e ácidos graxos	Melhora a utilização de gorduras animais e vegetais

Fonte: (Carvalho, 2013).

3.2.1. Fitases

As fitases vêm sendo comercializadas desde 1991, sendo as enzimas mais estudadas e utilizadas na nutrição de monogástricos (Selle & Ravindran, 2007). Elas vêm sendo amplamente aplicadas como adjuvantes na alimentação animal, pois atuam sobre o fitato, reduzindo esse fator antinutricional e liberando fósforo (Bhavsar et al., 2013).

O fósforo é um macromineral de extrema importância para os vertebrados, pois participa da constituição da matriz óssea, integra os fosfolipídeos da membrana celular, é constituinte dos ácidos nucleicos, participa de diversos sistemas enzimáticos, principalmente

aqueles relacionados com a produção de energia via ATP, e representa o 3º maior custo na alimentação de frango. Embora este mineral esteja presente em grandes quantidades nas matérias-primas utilizadas, encontra-se na forma de fitato, indisponível e como fator antinutricional (quelante de metais) (Carvalho, 2013).

O fitato ($C_6H_{18}O_{24}P_6$) é uma molécula cíclica simples, carreando seis grupos fosfato, com teor de fósforo de 28,16%. Esta molécula apresenta algumas características específicas de acordo com o ambiente em que se encontra. Em pH ácido, o fitato poderá estar levemente carregado negativamente ou em pH neutro/alcalino, fortemente carregado negativamente, conforme demonstrado nas Figuras 1 e 2 (Coulibaly et al., 2011). Nos vegetais, cerca de 60 a 90% do fósforo se encontra complexado na forma de mioinositol hexaquisfosfato (IP6) ou ácido fítico (Cheryan, 1980).

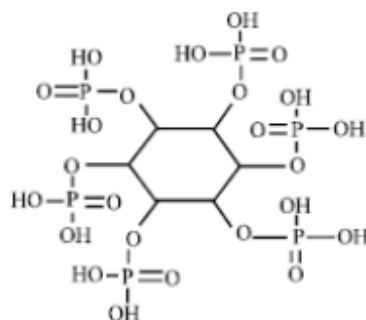


Figura 1. Estrutura do ácido fítico em pH ácido, elucidando o encontrado no proventrículo e moela de aves (Adaptado de Coulibaly et al., 2011).

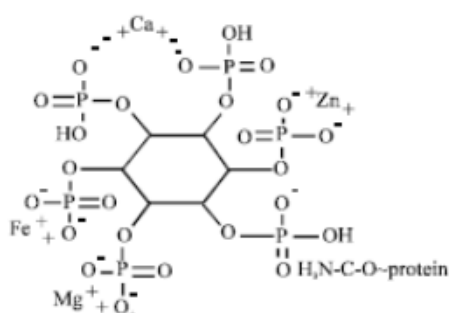


Figura 2. Estrutura do ácido fítico em pH básico, elucidando o encontrado a partir do duodeno em aves (Adaptado de Coulibaly et al., 2011).

O que impede a digestão do ácido fítico além da ausência da produção de fitase por animais, é a baixa solubilidade do ácido fítico no intestino delgado, o que depende da concentração de cátions no lúmen (Carvalho, 2013).

A fitase deve ser capaz de hidrolisar a molécula de fitato durante a digestão, antes de chegar ao duodeno, local onde o fitato pode quelar com cátions e precipitar, tornando sua hidrólise impraticável. Desta forma, segundo Igbasan (2000), para uma fitase atuar de maneira eficaz, ela deve apresentar estabilidade em pH, resistência ao processo de produção da ração, resistência à ação proteolítica e estabilidade no trato digestivo.

O tempo de permanência da ração no trato digestivo de frangos de corte é de aproximadamente 4h e 30 min, distribuídos da seguinte forma: aproximadamente 50 min no papo, 90 min no proventrículo e moela, 5 a 8 minutos no duodeno, 20 a 30 min no jejuno, 50 a 70 min no íleo e 25 min no reto. Como a fitase atua apenas em pH ácido, onde o substrato fitato está solúvel e passível de hidrólise, a mesma tem um tempo para atuação de aproximadamente 2h e 20min (Gauthier, 2002).

Segundo Schlemmer et al. (2001), a solubilidade do ácido fítico é extremamente dependente do número de fosfatos na molécula. As fitases microbianas têm capacidade de atuar nas ligações entre o carbono 3 ou 6 e liberar os grupos fosfato. Após a hidrólise do grupamento preferencial, a fitase e fosfatases endógenas realizam a sequência de hidrólises no anel de inositol independente das condições ambientais e solubilidade do meio (Adeola & Cowieson, 2011).

O aumento na digestibilidade do fósforo permite uma redução na inclusão de fosfato inorgânico à dieta, fonte esta que é não renovável e de alto custo, sendo o terceiro nutriente mais oneroso na formulação de rações, atrás de energia e proteína (Boling et al., 2000).

A redução na excreção de minerais também é um objetivo na inclusão de fitase na ração. O impacto ambiental da produção de aves e suínos é alvo de constantes críticas, podendo causar contaminação do lençol freático e eutrofização de cursos de água. O uso de fitase, ao melhorar a digestibilidade do fósforo, reduz a eliminação desse mineral no ambiente, reduzindo o impacto dessa atividade (Dessimoni, 2015).

3.2.2. *Proteases*

As proteases, além de participar como agente essencial no processo digestivo, são responsáveis pelo turnover proteico, modulação enzimática, regulação da expressão gênica, esporulação de micro-organismos e germinação de sementes. O papel desta classe de enzimas na indústria é bastante conhecido, sendo empregada no tratamento de couros, produção de cervejas, queijos e pães e na fabricação de detergentes (Aehle, 2007).

Segundo Chaud et al. (2007), as proteases de origem microbiana representam um atrativo, uma vez que os micro-organismos requerem espaço limitado para cultivo e são susceptíveis à manipulação genética.

Diversos benefícios são relatados com a adição de proteases exógenas nas rações como o aumento da digestibilidade de proteínas (Bedford & Partridge, 2011), hidrólise de fatores antinutricionais, tais como a lectinas e inibidores de tripsina (Huo et al., 1993; Ghazi et al., 2002) e redução na excreção de nitrogênio (Dessimoni, 2011).

A utilização de proteases nas dietas para monogástricos ainda carece de informações específicas, tais como pH e temperaturas ótimos de atuação, cinética e substrato ideal bem como seu modo de ação, já que proteases fúngicas e bacterianas, mesmo com respostas positivas in vitro, podem não apresentar os mesmos resultados in vivo (Adeola & Cowieson, 2011).

Apesar disso, a adição de proteases tem se mostrado benéfica na maioria das vezes, visto que a proteína é o nutriente mais oneroso das rações para monogástricos. No entanto, diversos estudos ainda vêm sendo realizados para se compreender os efeitos desse tipo de enzima na fisiologia do animal, garantindo sua eficiência de utilização (Carvalho, 2013)

Além disso, a suplementação com proteases microbianas possibilita a adição de fontes de proteínas não convencionais, que não são hidrolisadas pelas proteases presentes no sistema digestivo dos animais, aumentando as opções de adição de nutrientes com baixo valor agregado ou resíduos (Azeredo et al, 2006). A queratina presente na farinha de penas, é um bom exemplo de proteína não digerível pelos animais monogástricos.

3.2.3. Queratinases

As queratinases são enzimas proteolíticas que atacam ligações peptídicas na estrutura da queratina, presentes em grandes quantidades em penas, cabelos, unhas, chifres, escamas e lã, para convertê-las em formas simplificadas, o que torna essas enzimas potencialmente aplicáveis na indústria de alimentos, de detergentes, de cosméticos, de couro e têxteis além de aplicações específicas em biomedicina, biocombustíveis, biorremediação e tratamento de águas residuárias (Brandelli et al., 2015; Gopinath et al., 2015; Bhari et al., 2018).

Assim, várias enzimas queratinolíticas têm sido investigadas com o objetivo de hidrolisar queratina de penas para aumento da digestibilidade proteica e aplicação na formulação de rações (Gupta & Ramnani, 2006; Brandelli et al., 2010).

O uso original de uma enzima queratinase como aditivo alimentar foi relatado por Lee et al. (1991). Outros estudos relataram que o uso de Versazyme® (produto comercial à base de queratinase de *Bacillus licheniformis*) como aditivo à alimentação animal proporcionou aumento na conversão alimentar e melhorou a integridade intestinal das aves (Wang et al., 2006, Odetallah et al., 2005).

A queratinase de *B. licheniformis* aumentou a digestibilidade total dos aminoácidos das penas de 30 para 66% e das farinhas comerciais de penas de 77 para 99%. Os ganhos diários de peso de frangos com 3 semanas de idade foram de 66 g para soja, 50 g para farinha de penas e 56 g para penas tratadas com queratinase (Odetallah et al., 2005). Odetallah et al. (2003) também relataram que a queratinase aumentou significativamente a digestibilidade de uma farinha de penas comercial, possibilitando o uso desta farinha em substituição de até 7% da proteína da dieta para pintos em fase inicial de crescimento.

3.2.4. Lipases

As lipases apresentam grande relevância em reações de hidrólise e síntese, tendo como destaque a obtenção de lipídeos com melhores características nutricionais (Angajala et al., 2016).

Inicialmente, o uso de lipases em rações foi relativamente ignorado, uma vez que óleos e gorduras são ingredientes utilizados em menores quantidades nas rações. Porém, existe uma tendência crescente no setor de rações para utilização de lipases como aditivos (Wang et al. 2017).

As lipases têm sido utilizadas como alternativa para aumentar a digestão das gorduras, principalmente em rações aplicadas na alimentação de aves na fase inicial de crescimento, visto onde o sistema enzimático do animal ainda é imaturo e, portanto, ineficiente na digestão total das gorduras (Pugh, 1993; Garcia 2000).

Devido à algumas deficiências, incluindo inativação pela acidez gástrica, concentração fisiológica de sais biliares no intestino delgado e degradação por proteases do trato digestivo, a maioria das lipases não pode ser aplicada à ração animal como um suplemento para ingestão e efeito direto no organismo (Moreau et al. 1988; Zentler-Munro et al., 1992).

Embora alguns estudos com adição de lipases tenham encontrado resultados pouco conclusivos sobre o efeito da enzima no desempenho da produção de frangos (Kocher et al.,

2003; Olukosi et al., 2007; West et al., 2007), isso não significa necessariamente que os produtos enzimáticos não funcionem em seus substratos específicos.

Wang et al. (2017) avaliaram a adição de lipase de *Yarrowia lipolytica* em rações de frango e relataram que a adição da enzima promoveu uma melhoria no desempenho de crescimento dos frangos. Os experimentos foram feitos com 264 aves divididas em 3 grupos: 1 com ração controle sem adição de enzimas e 2 grupos com adição de 4 ou 6 U / g da lipase, sob condições controladas, no período de 1 a 42 dias. A taxa de conversão (FCR) apresentou valores significativamente menores para os grupos com adição de 6 e 4 U/g (1,577 e 1,591 respectivamente) em relação ao grupo controle (1,650) indicando um melhor desempenho de crescimento dos grupos adicionados de lipase.

Portanto, a fim de melhorar a estabilidade e a utilização de lipases, permanece a necessidade de melhores preparações enzimáticas que sejam resistentes às condições no estômago e no intestino delgado das aves.

3.3. *Aspergillus niger* e sua relação com a produção de ingredientes para rações animais

Os micro-organismos representam uma excelente fonte de enzimas devido à sua ampla diversidade bioquímica e susceptibilidade à manipulação genética. Fungos filamentosos, como algumas linhagens de *Aspergillus niger*, possuem longa tradição de uso na produção de enzimas e ácidos orgânicos e são listados como “GRAS” (Geralmente Reconhecidos como Seguros) pela FDA - Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (Schuster et al., 2002).

Linhagens de *Aspergillus niger* têm sido amplamente utilizadas na melhoria de subprodutos agrícolas por meio de sua ação em substratos como polissacarídeos e proteínas (Aderemi & Nworgu, 2007), ou modificando estruturalmente fatores antinutricionais (Hong et al., 2004).

Vários estudos demonstraram que linhagens de *Aspergillus niger* têm grande potencial para produção de fitase, com resultados superiores aos apresentados por outros fungos filamentosos (Murai, 2002; Elkhailil, 2007; Bhavsar et al. 2011).

A capacidade do *Aspergillus niger* para a produção de queratinases também foi relatada (Son et al., 2008; Lopes et al. 2011; Mazotto et al., 2013;). Lopes et al. (2011) avaliaram a produção de queratinases por *Aspergillus niger* utilizando diferentes substratos (cabelo humano, pêlos de porco, penas de frango e chifre bovino) e relataram que a farinha de penas

foi o substrato que permitiu a maior síntese da enzima pelo micro-organismo. Após um estudo prévio com 28 linhagens de *Aspergillus niger*, Mazotto et al. (2013) relataram que 4 linhagens mostraram-se promissoras para produção de queratinase e hidrólise de penas, em especial a linhagem de *A. niger* 3T5B8.

Adicionalmente, é importante destacar que os micro-organismos *Aspergillus niger* e *Candida utilis* são considerados atualmente as principais cepas probióticas aplicadas em frangos de corte (Tannock, 2001; Dei et al., 2008; Chen et al., 2009; Zhang et al., 2015).

A utilização micro-organismos e ingredientes fermentados em rações vem sendo investigada e tem apresentado diversos benefícios, tais como: a melhoria da saúde e eficiência intestinal de aves, aumento das vilosidades intestinais, melhoria na absorção de nutrientes, redução do pH do intestino, diminuição na proliferação de coliformes e patógenos, melhoria no desempenho de crescimento e redução da gordura abdominal (Engberg et al., 2009; Niba et al., 2009; Naji et al., 2015; Jazi et al., 2017).

O *A. niger* é um dos micro-organismos utilizados para fermentação ou adição em rações e que tem apresentado bons resultados em diferentes substratos: sementes de algodão (Jazi et al., 2017), folhas de ginkgo biloba (Cao et al., 2012; Zhang et al., 2015), pinha da espécie “*Pinus ponderosa*” (Wu et al., 2015) e adição diretamente na ração (Saleh et al., 2011).

Saleh et al. (2011) sugeriram que as enzimas produzidas por *Aspergillus awamori* e *Aspergillus niger* ajudariam no metabolismo da ave e que estes micro-organismos também poderiam ser utilizados como probiótico em rações, uma vez que os frangos alimentados com rações suplementadas com esses fungos apresentaram maior crescimento, melhor taxa de conversão, maior quantidade de músculo de peito e menor quantidade de gordura abdominal. Eles avaliaram 42 frangos entre as idades de 15 a 27 dias, em temperatura (25°C), umidade (50-70%) e luminosidade (ciclos de 14 horas de luz e 10 horas no escuro) controladas, divididos em 7 grupos: 1 grupo com ração controle e os demais com rações adicionadas em 3 concentrações de cada um dos fungos (50×10^3 / 25×10^4 / 50×10^4 esporos/g). A ração controle era composta por: milho, soja, óleo de soja, farinha de alfafa e suplementos de aminoácidos (lisina e metionina), de minerais e de vitaminas. Os resultados do experimento mostram que a adição do *A. niger* reduziu significativamente ($p \leq 0,01$) a taxa de conversão de ração em todos os tratamentos, de 1,89 no tratamento controle, para 1,50 / 1,52 / 1,62 nos tratamentos 50×10^3 / 25×10^4 / 50×10^4 respectivamente, indicando um maior peso de ave para o mesmo consumo de ração ou o mesmo peso de ave para um consumo menor de ração. A adição de *A. niger* também reduziu significativamente ($p \leq 0,01$) a quantidade de gordura abdominal das aves nos

tratamentos com maiores concentrações do fungo, de 0,60% no tratamento controle, para 0,17% / 0,24% nos tratamentos 25×10^4 / 50×10^4 respectivamente.

Jazi et al. (2017) utilizaram uma mistura de *Bacillus subtilis* (PTCC1156), *Aspergillus oryzae* (PTCC5163) e *Aspergillus niger* (PTCC5010) para fermentação de farinha de sementes de algodão. Para cada 1 kg de semente de algodão foram adicionados 1,2 L de água contendo 10^5 UFC/mL de cada um dos micro-organismos. A mistura foi fermentada durante 7 dias a 30°C, e a farinha fermentada foi seca por 3 dias a 50°C. Eles utilizaram 300 frangos divididos em 5 grupos com 5 repetições: 1 grupo com ração controle e 2 grupos com ração adicionada farinha de sementes de algodão (10 e 20%) e 2 grupos com ração adicionada de farinha fermentada de sementes de algodão (10 e 20%). As farinhas de semente de algodão foram utilizadas em substituição à soja. Eles utilizaram rações controle (inicial 1-21 dias e crescimento 22-42 dias) com diferentes concentrações de: milho, soja, óleo de girassol e suplementos de aminoácidos (lisina e metionina), de minerais e de vitaminas. Os autores reportaram que a fermentação reduziu um fator antinutricional (gossipol) presente na semente de algodão. A farinha fermentada também promoveu melhoria no desempenho de crescimento e na saúde intestinal dos frangos indicando que ela pode ser uma fonte alternativa para a soja na formulação de rações. Os resultados do experimento mostram que a semente de algodão fermentada apresentou taxas de conversão de 1,89 / 1,90 para os tratamentos 10 e 20%, valores semelhantes ao controle que foi de 1,90, e significativamente menor ($p \leq 0,05$) em relação à semente de algodão não fermentada, que foi de 1,94 / 2,00 para os tratamentos 10 e 20%, indicando que a fermentação pode ser uma alternativa para viabilizar o uso da semente de algodão em rações. A fermentação também reduziu significativamente ($p \leq 0,05$) a quantidade de gordura abdominal das aves para 1,18% / 1,13% para os tratamentos 10 e 20%, em relação aos valores de 1,43% / 1,52% / 1,76% dos tratamentos controle e 10 e 20% de semente de algodão não fermentada.

Os resultados de Jazi et al. (2017) mostram que a fermentação da semente de algodão também proporcionou um aumento significativo ($p \leq 0,05$) na relação entre as vilosidades e criptas intestinais do duodeno (7,48 / 7,52) e do jejuno (8,38 / 7,74) em relação aos tratamentos controle e 10 e 20% de semente de algodão não fermentada que apresentaram respectivamente no duodeno (6,63 / 6,05 / 5,41) e no jejuno (6,32 / 5,76 / 5,89), indicando um aumento da área intestinal com melhora na absorção de nutrientes. E reduziu significativamente ($p \leq 0,05$) o pH do intestino das aves (6,06 / 6,01) e da cama do aviário (4,40 / 4,29) em relação ao tratamento controle e 10 e 20% de semente de algodão não fermentada que apresentaram

respectivamente no intestino (6,45 / 6,40 / 6,62) e no jejuno (4,61 / 4,64 / 4,63), a redução do pH proporciona um maior desenvolvimento das bactérias lácticas reduzindo por competição o desenvolvimento de patógenos e outros coliformes.

Zhang et al. (2015) utilizaram *Candida utilis*, *Aspergillus niger* e uma combinação dos dois micro-organismos para fermentação de folhas de ginko biloba. O substrato de folhas de ginko biloba, farelo de trigo e espiga de milho (8:1,5:0,5) foi preparado mediante três processos fermentativos: o primeiro com adição de 10% de solução $6-9 \times 10^9$ UFC/mL de *C. utilis* e fermentação por 48h a 28–30°C; o segundo com adição de 0,1% de solução $4,0 \times 10^6$ esporo/mL de *A. niger* e fermentação por 48h a 28–30°C, e o terceiro com adição 10% de solução $6-9 \times 10^9$ UFC/mL de *C. utilis* e fermentação por 24h a 28–30°C, seguida pela adição de 20% de solução $4,0 \times 10^6$ esporo/mL de *A. niger* e fermentação por 84h a 28–30°C. Neste trabalho foram utilizados 240 frangos divididos em 4 grupos e 6 repetições: 1 grupo com ração controle, 1 grupo com ração adicionada de 0,5% de fermentado de *C. utilis* (FC), 1 grupo com ração adicionada de 0,5% de fermentado de *A. niger* (FA) e 1 grupo com ração adicionada de 0,5% de fermentado de ambos os micro-organismos (FCA). O trabalho foi conduzido com ração controle (inicial 1-21 dias e crescimento 22-42 dias) composta de milho, soja, farelo de trigo, gordura e suplementos de aminoácidos (lisina e metionina), de minerais e de vitaminas. Os frangos alimentados com suplementação das farinhas fermentadas apresentaram melhoria nos resultados de crescimento e na saúde intestinal, sendo reportado também a redução da contagem de patógenos (*Escherichia coli* e *Salmonella sp.*) nos intestinos das aves. Os resultados do experimento mostram que a adição de ginko biloba fermentada por *A. niger* reduziu significativamente ($p \leq 0,05$) a taxa de conversão de ração, de 1,74 para 1,67 em relação ao tratamento controle, indicando um maior ganho de peso de ave para um consumo menor de ração.

Os resultados de Zhang et al. (2015) mostram que a fermentação da ginko biloba também proporcionou um aumento significativo ($p \leq 0,05$) na relação entre as vilosidades e criptas intestinais do duodeno (8,14), do jejuno (6,97) e do íleo (8,54) em relação ao tratamento controle que apresentou no duodeno (7,37), no jejuno (5,89) e no íleo (7,71), indicando um aumento da área intestinal com melhora na absorção de nutrientes. E reduziu significativamente ($p \leq 0,05$) a contagem de salmonela no ceco (7,22 Log₁₀ UFC/g) em relação ao tratamento controle (8,19 Log₁₀ UFC/g).

Diante dos resultados reportados pela adição de *A. niger* em rações, tanto na forma direta ou por meio de substratos fermentados, e devido à grande diversidade de enzimas produzidas por linhagens deste fungo filamentoso, fica evidente o potencial de aplicação de *A. niger* para melhoria das características nutricionais da farinha de penas e uso em rações para aumento no crescimento das aves e redução dos custos de produção.

4. Material e Métodos

4.1. Micro-organismo

O fungo filamentoso empregado neste trabalho foi a linhagem de *Aspergillus niger* LBA02 pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas.

4.2. Produção do pré-inóculo para fermentação

A linhagem de *Aspergillus niger* LBA02 foi repicada e mantida em tubos de ensaio contendo ágar dextrose de batata. Para a produção do pré-inóculo, o micro-organismo foi inoculado em um meio composto por 10 g de farelo de trigo e 5 mL de solução aquosa contendo fosfato de sódio monobásico 1,7% (m/v) e sulfato de amônio a 2,0% (m/v) com posterior incubação durante 72h a 30°C. Os esporos de fungos foram removidos do meio utilizando uma solução estéril de Tween 80 (0,3% m/v). O número de esporos por mL na suspensão de esporos foi determinado por contagem em câmara de Neubauer.

4.3. Produção de enzimas hidrolíticas em fermentação semissólida utilizando a técnica de planejamento experimental

Testes iniciais foram realizados utilizando a farinha de penas e sangue (doadas pela Empresa Ad'oro S.A.) como único substrato. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 40 g de meio de cultivo umedecidos com água com umidade inicial do meio de cultivo ajustada para 50%. Os frascos foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, inoculados com suspensão de esporos (10^7 esp. g⁻¹) e incubados durante 144h com amostras coletadas a cada 24h. A extração do complexo enzimático foi realizada pela homogeneização do meio fermentado com 100 mL de solução tampão acetato 200 mM pH 5,0 e posterior filtração.

Após os testes iniciais, para determinação das condições mais adequadas para o cultivo de *A. niger* e máxima produção de protease, lipase, fitase e queratinase, foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) contendo 17 ensaios para a avaliação dos efeitos da umidade inicial do meio de cultivo, temperatura de incubação e suplementação do meio com farelo de trigo. Os ensaios foram conduzidos de forma semelhante ao descrito anteriormente nos tempos de 48, 72 e 96h de fermentação. Os níveis codificados e os valores reais das variáveis independentes utilizados nos experimentos são apresentados na Tabela 4 e a matriz do DCCR com as combinações das variáveis independentes nos diferentes ensaios é apresentada na Tabela 5.

Tabela 4. Variáveis independentes e níveis do planejamento experimental DCCR para determinação das condições de cultivo de *A. niger* LBA02 em farinha de penas e sangue e produção simultânea de enzimas hidrolíticas.

Variáveis Independentes	Níveis				
	-1,68	-1,00	0,00	+1,00	+1,68
Temperatura (°C)	20	24	30	36	40
Umidade (%)	35	41	50	59	65
Adição de Farelo de Trigo (%)	5	9	15	21	25

Tabela 5. Matriz do DCCR para o estudo dos efeitos das variáveis independentes umidade, temperatura de incubação e adição de farelo de trigo sobre a produção simultânea de enzimas hidrolíticas por *A. niger* LBA02 utilizando farinha de penas e sangue como substrato semissólido.

Ensaio	Umidade (%)	Temperatura (°C)	Adição Farelo Trigo (%)
1	-1,00 (41)	-1,00 (24)	-1,00 (9)
2	-1,00 (41)	-1,00 (24)	+1,00 (21)
3	-1,00 (41)	+1,00 (36)	-1,00 (9)
4	-1,00 (41)	+1,00 (36)	+1,00 (21)
5	+1,00 (59)	-1,00 (24)	-1,00 (9)
6	+1,00 (59)	-1,00 (24)	+1,00 (21)
7	+1,00 (59)	+1,00 (36)	-1,00 (9)
8	+1,00 (59)	+1,00 (36)	+1,00 (21)
9	-1,68 (35)	0,00 (30)	0,00 (15)
10	+1,68 (65)	0,00 (30)	0,00 (15)
11	0,00 (50)	-1,68 (20)	0,00 (15)
12	0,00 (50)	+1,68 (40)	0,00 (15)
13	0,00 (50)	0,00 (30)	-1,68 (5)
14	0,00 (50)	0,00 (30)	+1,68 (25)
15	0,00 (50)	0,00 (30)	0,00 (15)
16	0,00 (50)	0,00 (30)	0,00 (15)
17	0,00 (50)	0,00 (30)	0,00 (15)

4.4. Validação experimental dos modelos estatísticos e cinética de produção enzimática

Após a avaliação dos efeitos das variáveis independentes no DCCR, a condição selecionada como mais adequada para o cultivo de *A. niger* LBA02 e produção simultânea das enzimas protease, lipase, fitase e queratinase, foi utilizada para validação experimental dos modelos estatísticos. Para tal, a fermentação semissólida foi repetida nestas condições, em triplicata, durante uma cinética de produção de 96h com retirada de amostras a cada 24 h. Os extratos enzimáticos brutos obtidos foram congelados e utilizados para a determinação das atividades de protease, lipase, fitase e queratinase e do perfil cinético de produção de cada uma destas enzimas.

4.5. Concentração dos extratos enzimáticos

Definidas as melhores condições de cultivo em função dos efeitos das variáveis independentes e da cinética de produção, a fermentação foi repetida em 40 frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 40 g de meio de cultivo umedecidos com água. A extração do complexo enzimático foi realizada pela homogeneização do meio fermentado com 100 mL de solução tampão acetato 200 mM pH 5,0 e posterior filtração. O extrato enzimático bruto foi adicionado de sulfato de amônio na quantidade de 561 g/L de extrato (80% de saturação) até completa solubilização para precipitação das proteínas (enzimas). Após 16 h de repouso sob refrigeração, a solução foi centrifugada a 17 000 x g por 10 min a 5°C. O precipitado foi recolhido, ressuspenso em água destilada e colocado em membrana de celulose para dialisar contra água destilada. Após a diálise, o material concentrado foi congelado e liofilizado para posteriores análises de caracterização bioquímica.

4.6. Determinação das condições de pH e temperatura para máxima atividade das enzimas protease, lipase e fitase de *A. niger* LBA02 por planejamento experimental

Para determinação das condições de pH e temperatura para máxima atividade das enzimas de *A. niger* LBA02, foi utilizado o extrato enzimático concentrado e um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com 11 ensaios. As variáveis e os níveis estudados no DCCR estão apresentados na Tabela 6 e a matriz do DCCR com as combinações das variáveis independentes nos diferentes ensaios é apresentada na Tabela 7.

Tabela 6. Variáveis independentes e níveis codificados do DCCR para determinação do pH e temperatura para máxima atividade das enzimas de *A. niger* LBA02.

Variáveis Independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
pH	2,0	3,0	5,5	8,0	9,0
Temperatura (°C)	35,0	39,4	50,0	60,6	65,0

Tabela 7. Matriz do DCCR para o estudo dos efeitos das variáveis independentes pH e temperatura sobre a atividade das enzimas protease, lipase, fitase e queratinase produzidas por *A. niger* LBA02 utilizando farinha de penas e sangue como substrato semissólido.

Ensaio	Valores codificados e reais	
	pH	Temperatura (°C)
1	-1,00 (3,0)	-1,00 (39,4)
2	+1,00 (8,0)	-1,00 (39,4)
3	-1,00 (3,0)	+1,00 (60,6)
4	+1,00 (8,0)	+1,00 (60,6)
5	-1,41 (2,0)	0,00 (50,0)
6	+1,41 (9,0)	0,00 (50,0)
7	0,00 (5,5)	-1,41 (35,0)
8	0,00 (5,5)	+1,41 (65,0)
9	0,00 (5,5)	0,00 (50,0)
10	0,00 (5,5)	0,00 (50,0)
11	0,00 (5,5)	0,00 (50,0)

4.7. Determinação da atividade das enzimas hidrolíticas

Os extratos enzimáticos brutos ou concentrados obtidos a partir da fermentação da farinha de penas e sangue com *A. niger* LBA02 foram utilizados para a determinação das atividades enzimáticas de protease, lipase, fitase e queratinase.

As condições de ensaio descritas a seguir foram utilizadas de forma padronizada para a determinação da atividade enzimática nas etapas de produção e estudo dos parâmetros de cultivo (item 4.3) e na cinética de produção das enzimas (item 4.4). Para caracterização bioquímica das enzimas, as condições de reação foram ajustadas de acordo com os níveis do delineamento experimental.

4.7.1. Determinação da atividade de protease

A atividade proteolítica utilizando azocaseína como substrato foi determinada segundo a metodologia de Charney & Tomarelli (1947) utilizando azocaseína como substrato. A mistura reacional contendo 0,5 mL de azocaseína (0,5% m/v), pH 5,0 e 0,5 mL de solução enzimática foi incubada por 40 min a 50°C. A reação foi paralisada pela adição de 1,0 mL de solução de ácido tricloroacético (10% m/v). A mistura reacional foi centrifugada a 17 000 x g por 15 minutos e o sobrenadante coletado. A formação do composto cromóforo ocorreu pela adição de 1,0 mL de solução de hidróxido de potássio 5 N a 1,0 mL do sobrenadante da mistura reacional e a leitura de absorbância foi realizada a 428nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir uma diferença de 0,01 na absorbância a 428 nm por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições do ensaio, sendo expressa em U por g de substrato seco (U/g).

Para caracterização bioquímica das enzimas, as condições de reação foram ajustadas de acordo com os níveis do delineamento experimental.

4.7.2. Determinação da atividade de lipase

A atividade enzimática de lipase foi medida em um sistema contendo 5 mL de emulsão composta por óleo de oliva extra virgem e solução de goma arábica 7% (proporção de 25% de óleo de oliva para 75% de solução de goma), 2 mL de tampão fosfato pH 7,0 (100 mM) e 1 mL de extrato enzimático. A mistura reacional foi incubada a 40°C por 30 minutos em banho termostático com agitação de 150 rpm. A reação foi paralisada pela adição de 15 mL de solução acetona:etanol (1:1 v:v) e os ácidos graxos liberados foram titulados contra uma solução de NaOH (50 mM). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar 1 μ mol de ácido graxo por minuto por mL do sobrenadante nas condições reacionais (Silva et al., 2015). A atividade enzimática de lipase foi corrigida e os valores finais expressos em U por g de substrato seco (U/g).

Para a caracterização bioquímica das enzimas, as condições de reação foram ajustadas de acordo com os níveis do delineamento experimental.

4.7.3. Determinação da atividade de fitase

A atividade de fitase foi determinada conforme o método descrito por Bhavsar et al. (2013). A mistura reacional contendo 150 μ L de extrato enzimático bruto e 600 μ L de solução de fitato de sódio (2 mM) em tampão acetato (200 mM) pH 5,0 foi incubada em banho

termostático a 37°C por 10 minutos. Uma alíquota de 700 µL de ácido tricloroacético (5% m/v) foi adicionada para paralisar a reação. A solução resultante foi centrifugada a 17 000 x g por 15 minutos e o fósforo inorgânico foi determinado colorimetricamente a 700 nm no sobrenadante de acordo com o método de molibdato de amônio proposto por Heinonen & Lahti (1981). Uma unidade de atividade de fitase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de fósforo inorgânico por minuto por mL de extrato enzimático, nas condições reacionais. A atividade enzimática de fitase foi corrigida e os valores finais expressos em U por g de substrato seco (U/g).

Para a caracterização bioquímica das enzimas, as condições de reação foram ajustadas de acordo com os níveis do delineamento experimental.

4.7.4. Determinação da atividade de queratinase

A atividade de queratinase foi determinada conforme o método descrito por Sahoo et al. (2012) utilizando keratin azure (Sigma) como substrato. A mistura reacional contendo 2 mg de keratin azure, 500 µL de extrato enzimático bruto e 500 µL de solução tampão de HCl (100 mM) pH 8,0 foi incubada em banho termostático a 50°C por 30 minutos. Uma alíquota de 1000 µL de ácido tricloroacético (10% m/v) foi adicionada para paralisar a reação. A solução resultante foi centrifugada a 17 000 x g a 25°C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado para leitura em espectrofotômetro a 280 nm. Uma unidade de atividade de queratinase foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir uma diferença de 0,01 na absorbância a 280 nm por minuto de reação entre o branco reacional e a amostra nas condições do ensaio, sendo expressas em U por g de substrato seco (U/g). O branco utilizado consistiu na mesma mistura de reação, porém, com a adição do ácido tricloroacético (10% m/v) antes do extrato enzimático.

Para a caracterização bioquímica das enzimas, as condições de reação foram ajustadas de acordo com os níveis do delineamento experimental.

4.8. Análise de digestibilidade de proteína em pepsina 0,02%

A digestibilidade de proteína do material fermentado nas condições selecionadas como mais adequadas para produção simultânea das enzimas hidrolíticas foi realizada conforme o método 46 do compêndio brasileiro de nutrição animal (2009). A amostra original do meio de cultura e o meio de cultura fermentado foram inicialmente autoclavados a 121 °C por 30 minutos. A mistura reacional contendo 1,0 g do meio de cultura fermentado e 75 mL da solução

de pepsina 0,02 % (em HCl 0,075 N) foi incubada sob agitação de 150 rpm em banho termostático a 45°C por 24 h. Após a digestão, o material foi centrifugado a 4 000 x g por 15 minutos e filtrado em papel filtro. O extrato sobrenadante e a amostra original tiveram os níveis de proteína bruta quantificados pelo método de Kjeldahl (fator de conversão = 6,25). A digestibilidade foi calculada por meio da relação entre a proteína bruta no extrato sobrenadante e a proteína bruta na amostra original.

4.9. Análises estatísticas

Para os planejamentos experimentais aplicados para o estudo das variáveis independentes sobre a produção das enzimas hidrolíticas assim como para caracterização bioquímica, equações de segunda ordem foram utilizadas para definição dos modelos, como mostrado abaixo:

$$Y = \beta_o + \sum_{i=1}^n \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \beta_{ij} x_i x_j$$

Onde Y representa a resposta estimada pelo modelo, i e j correspondem à variação de 1 ao número de variáveis (n), β_o é a média, β_i e β_{ij} representam os coeficientes lineares e quadráticos, respectivamente; x_i e x_j são as variáveis independentes codificadas. O coeficiente de correlação múltipla (R^2) e o teste de Fisher (análise de variância-ANOVA) foram utilizados para verificar a adequação estatística dos modelos propostos codificados aos pontos reais. O software Statistica 13.3.1 da companhia TIBCO Software Inc. (Palo Alto, California, EUA) foi utilizado para o planejamento experimental, análise de dados e construção de modelos.

Os resultados também foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey com o auxílio do software Minitab® 18 de Minitab Inc. (Pensilvânia, EUA). Os valores foram expressos como média aritmética e considerados estatisticamente diferentes quando os valores de p foram inferiores a 0,05.

5. Resultados e Discussão

5.1. Fermentação da farinha de penas

Os resultados da fermentação por *A. niger* LBA02 utilizando a farinha de penas como único substrato sólido, com umidade inicial de 50% e temperatura de incubação de 30°C estão apresentados na Figura 3.

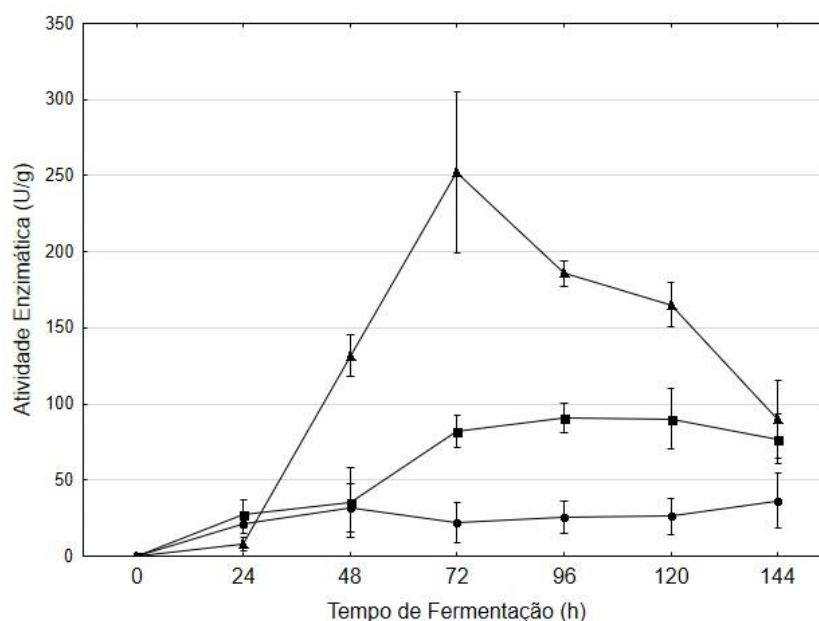


Figura 3. Produção de protease (▲), lipase (■) e fitase (●) por *A. niger* LBA02 em diferentes tempos de fermentação semissólida utilizando farinha de penas como único substrato.

A produção de enzimas após 24 h de fermentação foi baixa, com média de 8 U/g para protease, 28 U/g para lipase e 21 U/g para fitase. Após 48 h de fermentação, a produção de protease apresentou aumento significativo e atingiu 132 U/g, enquanto as demais enzimas continuaram com baixos valores de produção, detectando-se aproximadamente 35 e 32 U/g para lipase e fitase, respectivamente. Após 72 h de fermentação, a produção de protease alcançou um valor máximo de 252 U/g, a produção de lipase também apresentou aumento significativo atingindo 82 U/g, enquanto a produção de fitase manteve-se com valor de aproximadamente 22 U/g. Após 96 h de fermentação, observou-se queda nos valores de produção de protease para 186 U/g, aumento da produção de lipase alcançando seu valor máximo de 91 U/g, e a manutenção dos valores de produção para fitase em aproximadamente 25 U/g. Após 120 e 144 horas de fermentação, observou-se a tendência de queda na produção de protease e a manutenção dos valores de produção das demais enzimas (Figura 3).

Os resultados confirmaram a capacidade do micro-organismo *A. niger* LBA02 em produzir proteases, lipases e fitases utilizando a farinha de penas e sangue como substrato, com picos de produção enzimática detectados entre 48 e 96 h de fermentação. Os resultados também evidenciaram uma dificuldade inicial para produção das enzimas no meio semissólido composto unicamente pela farinha de penas e sangue. Diante destes resultados e com o objetivo de verificar a influência de diferentes parâmetros de cultivo sobre a produção simultânea das enzimas, um delineamento experimental do tipo DCCR foi utilizado como estratégia para estudo da umidade inicial do meio de cultivo, temperatura de incubação e incorporação de farelo de trigo no meio base composto por farinha de penas e sangue. Umidade e temperatura de incubação foram escolhidas por serem parâmetros clássicos na otimização de processos fermentativos para produção de ingredientes por biotecnologia. A utilização de farelo de trigo como suplementação da farinha de penas e sangue, visou fornecer um substrato de melhor assimilação pelo micro-organismo no intuito de facilitar sua adaptação, crescimento e consequentemente produção das enzimas. Muitos estudos indicam que o farelo de trigo é um substrato adequado para a produção de enzimas por fermentação em estado sólido (Chutmanop et al., 2008; Gunashree, et al. 2008; Bhavsar et al., 2011; De Castro et al., 2014; Zhao et al., 2019).

5.2. Estudo dos parâmetros de processo sobre a produção das enzimas

5.2.1. Produção de Protease

Os resultados obtidos para produção de protease nos 17 ensaios do DCCR durante a cinética de fermentação estão apresentados na Tabela 8. Os valores variaram de 5,98 U/g (ensaio 8 após 48h de fermentação) a 387,85 U/g (ensaio 13 após 48h de fermentação). Como a condução dos experimentos durante 48h de fermentação mostrou-se mais adequada para a produção de proteases, a análise de efeitos, ANOVA e geração das curvas de contorno foram realizadas nesta condição. As Tabelas contendo os coeficientes de regressão para as fermentações de 72 h e 96h estão disponíveis no anexo A.

Após 48 h de fermentação, os fatores que apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p \leq 0,10$) para a produção de protease foram os termos linear e quadrático da umidade e o termo quadrático da temperatura. No entanto, todos os termos significativos apresentaram efeitos negativos, indicando que o aumento destes fatores resultou em diminuição da produção da enzima (Tabela 9).

Tabela 8. Matriz do DCCR 2³ contendo ensaios e respostas para cultivo semissólido de *A. niger* LBA02 utilizando farinha de penas e sangue como substrato para a produção de protease durante 48, 72 e 96 h de fermentação.

Ensaio	Umidade (%)	Temperatura (°C)	Farelo de Trigo (%)	Atividade de Protease (U/g)		
				48 h	72 h	96 h
1	-1,00 (41)	-1,00 (24)	-1,00 (9)	122,12	246,48	175,91
2	-1,00 (41)	-1,00 (24)	+1,00 (21)	85,25	229,15	273,09
3	-1,00 (41)	+1,00 (36)	-1,00 (9)	250,97	131,86	96,53
4	-1,00 (41)	+1,00 (36)	+1,00 (21)	162,27	78,33	83,24
5	+1,00 (59)	-1,00 (24)	-1,00 (9)	92,16	222,32	84,30
6	+1,00 (59)	-1,00 (24)	+1,00 (21)	56,25	251,01	52,04
7	+1,00 (59)	+1,00 (36)	-1,00 (9)	70,40	32,84	40,67
8	+1,00 (59)	+1,00 (36)	+1,00 (21)	5,98	31,01	57,26
9	-1,68 (35)	0,00 (30)	0,00 (15)	223,40	216,37	167,00
10	+1,68 (65)	0,00 (30)	0,00 (15)	153,00	74,14	86,75
11	0,00 (50)	-1,68 (20)	0,00 (15)	70,38	55,53	192,75
12	0,00 (50)	+1,68 (40)	0,00 (15)	32,40	14,35	8,25
13	0,00 (50)	0,00 (30)	-1,68 (5)	387,85	191,65	50,35
14	0,00 (50)	0,00 (30)	+1,68 (25)	314,25	49,63	28,43
15	0,00 (50)	0,00 (30)	0,00 (15)	323,70	32,80	34,98
16	0,00 (50)	0,00 (30)	0,00 (15)	305,30	28,60	35,58
17	0,00 (50)	0,00 (30)	0,00 (15)	317,48	30,90	39,43

Tabela 9. Coeficientes de regressão do DCCR 2³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de *A. niger* LBA02 e produção de protease após 48h de fermentação semissólida utilizando farinha de penas e sangue como substrato.

Fator	Coeficientes	Erro Padrão	t (7)	p-Valor
Média	320,91	36,56	8,78	<0,001
(1)Umidade (%) (L)*	-37,65	17,17	-2,19	0,064
Umidade (%) (Q)*	-63,65	18,90	-3,37	0,012
(2)Temperatura (°C) (L)	5,12	17,17	0,30	0,774
Temperatura (°C) (Q)*	-112,03	18,90	-5,93	<0,001
(3)Farelo de Trigo (%) (L)	-25,61	17,17	-1,49	0,179
Farelo de Trigo (%) (Q)	-6,08	18,90	-0,32	0,757
1L x 2L	-34,74	22,43	-1,55	0,165
1L x 3L	3,16	22,43	0,14	0,892
2L x 3L	-10,04	22,43	-0,45	0,668

*Termos significativos (p-valor ≤ 0,10). L = linear; Q = quadrático

A análise de variância (ANOVA) demonstrou que a regressão foi significativa, visto que o valor de F calculado foi maior que F tabelado, e o coeficiente de múltipla correlação (R²) foi 0,80, indicando que o modelo (Equação 1) foi capaz de explicar 80% da variação dos resultados e pode ser utilizado para prever as respostas de produção de protease de *A. niger* LBA02 nas condições de ensaio avaliadas (Tabela 10).

Tabela 10. ANOVA para determinação das condições mais adequadas de cultivo de *A. niger* LBA02 e produção de protease após 48h de fermentação semissólida utilizando farinha de penas e sangue como substrato.

Fontes de variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}
Regressão	187365,44	4	46841,36	11,69
Resíduos	48086,47	12	4007,21	
Total	235451,91	16		

$Atividade\ de\ Protease = 320.91 - 37.65(x_1) - 63.65(x_1)^2 + 5.12(x_2) - 112.03(x_2)^2$ (Equação 1)

$F_{0,1; 4,12}$ (F tabelado) = 2,48, $R^2 = 0,80$, p-valor = 0,0004

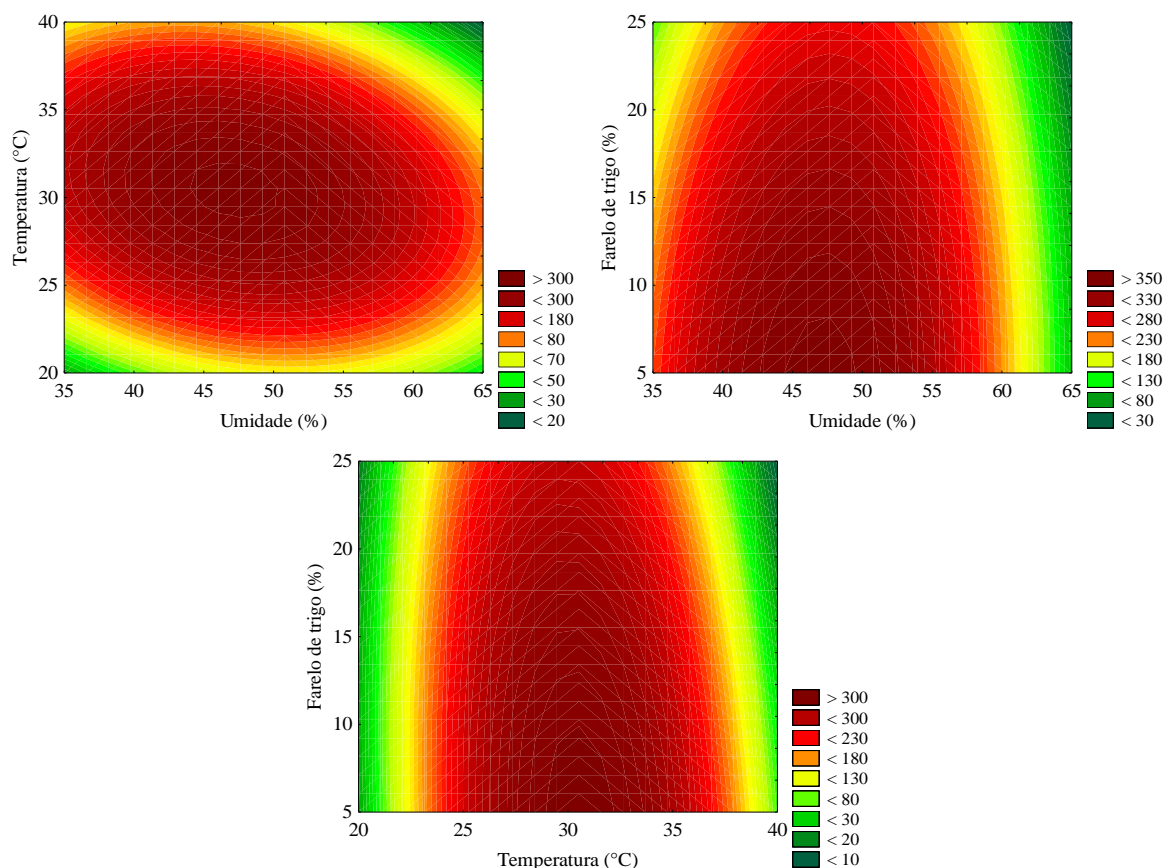


Figura 4. Curvas de contorno para a produção de protease (U/g) por *A. niger* LBA02 após 48h de fermentação semissólida utilizando farinha de penas e sangue como substrato em função das variáveis independentes umidade inicial do meio de cultivo, temperatura de incubação e suplementação do meio com farelo de trigo.

A análise das curvas de contorno para produção de protease mostrou que os maiores valores de atividade foram detectados na região dos pontos centrais do delineamento experimental, onde a umidade inicial foi de 50%, a temperatura de incubação de 30°C e a quantidade de farelo de trigo incorporada à farinha de penas foi de 15%. Nessas condições, a atividade de protease foi superior a 300 U/g. É importante ainda destacar que a umidade e a temperatura foram os fatores de maior importância na síntese desta enzima por *A. niger* LBA02 (Figura 4).

Segundo De Castro & Sato (2015), a umidade tem papel importante no desenvolvimento de fungos em fermentação semissólida, uma vez que interfere diretamente nas características físicas do substrato sólido. Eles apontam dois parâmetros (capacidade de absorção do meio e o ponto crítico de umidade) como determinantes para o processo. Meios com alta capacidade de absorção de água costumam ter melhores resultados pois apresentam maior porosidade devido ao inchaço das partículas sólidas com a absorção de água e também conseguem manter o nível de umidade durante todo o processo de fermentação. No entanto, se a quantidade de água adicionada for elevada ao ponto de ser completamente absorvida pelo meio, ocorre uma diminuição da porosidade, perda da estrutura das partículas sólidas e uma redução na troca de gases, o que prejudica o desenvolvimento microbiano e produção de enzimas. É provável que a temperatura também apresente um papel importante, uma vez que o aumento da temperatura pode acelerar a perda de água do meio ao longo do tempo da fermentação.

Embora a adição de farelo de trigo não tenha apresentado efeitos estatisticamente significativos sobre a produção de protease nos ensaios do delineamento experimental, o pico de produção obtido com sua adição (acima de 300 U/g após 48 horas) foi superior ao encontrado na fermentação inicial realizada apenas com a farinha de pena como substrato (aproximadamente 250 U/g após 72 horas) e também foi obtido com um menor tempo de fermentação.

De Castro et al. (2014) avaliaram a produção de protease pela mesma linhagem de *A. niger* LBA02 em fermentação semissólida sob as mesmas condições de umidade (50%) e temperatura (30°C), utilizando três diferentes substratos (farelos de trigo, de soja e de algodão). Neste estudo, as maiores produções de protease foram obtidas em 96 h para o farelo de trigo (186,42 U/g), em 48 h para o farelo de soja (152,38 U/g) e em 96 h para o farelo de algodão (118,83 U/g), resultados inferiores aos obtidos na fermentação da farinha de pena adicionada de farelo de trigo. A quantidade de proteína bruta existente na farinha de pena pode ter sido um dos fatores que proporcionou uma maior produção de protease.

Anusha et al. (2017) avaliaram a produção de protease por 4 linhagens de fungos em fermentação semissólida e fermentação submersa de torta de palmiste. Eles observaram produções inferiores de protease para o *A. niger* SDTC SRW4 e o *A. niger* DSMZ 2466 respectivamente: 29,07 U/g e 31,07 U/g após 10 dias em fermentação semissólida; 1,28 U/mL e 3,18 U/mL após 8 dias em fermentação submersa. O estudo também sugere que a produção

de enzimas por linhagens de *A. niger* apresente melhores resultados na fermentação semissólida quando comparados com a fermentação submersa.

Outros trabalhos de fermentação semissólida com fungos apresentaram melhores resultados de produção enzimática. Zhao et al. (2017) avaliaram a produção de protease por *A. oryzae* em fermentação semissólida e fermentação submersa de uma mistura de farelo de soja e farelo de trigo. Eles obtiveram maiores valores de atividade de protease após 33 horas, sendo que a fermentação sólida (2331 U/g) apresentou valores 4,9 vezes superiores aos resultados da fermentação submersa (477 U/g).

Outro estudo com fermentação semissólida por fungos do gênero *Aspergillus* reforça a influência da umidade e da suplementação com farelo de trigo. Chutmanop et al. (2017) avaliaram a produção de protease por *A. oryzae* em fermentação semissólida de farelo de arroz com e sem suplementação de farelo de trigo. Eles obtiveram maiores valores de atividade de protease (1200 U/g) após 4 dias com o substrato composto por uma mistura de farelo de trigo e farelo de arroz, umidade de 50% e pH de 7,5. O estudo também mostrou que as seguintes variáveis independentes adição de farelo de trigo, umidade inicial do meio de cultivo e pH inicial do meio apresentaram impacto estatisticamente significativos.

Lemes et al. (2016) avaliaram a fermentação de farinha de pena por *Bacillus sp.* P45 em fermentação submersa e obteve os melhores resultados de produção de protease (699,3 U/g) após 48h de fermentação. Azeredo et al. (2006) também utilizaram farinha de penas como substrato para a produção de proteases em processos fermentativos semissólido e submerso com *Streptomyces sp.* 594, observando produções de 13,4 U/mL no processo submerso e 21,5 U/g em fermentação semissólida.

5.2.2. Produção de Lipase

Os resultados obtidos para produção de lipase nos 17 ensaios do DCCR durante a cinética de fermentação estão apresentados na Tabela 11. Os valores variaram de 13,70 U/g (ensaio 6 após 48h de fermentação) a 123,45 U/g (ensaio 5 após 96h de fermentação). A condição de 96h de fermentação foi a que apresentou a maior produção média entre os tempos de fermentação, atingindo 80,10 U/g. No entanto, as maiores produtividades foram detectadas em 48h de fermentação, sendo este tempo selecionado para apresentação da análise de efeitos, ANOVA e geração das curvas de contorno. As Tabelas com os coeficientes de regressão para a produção de lipase após 72 h e 96h estão apresentadas no anexo B.

Após 48h de fermentação, os fatores que apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p \leq 0,10$) para a produção de lipase foram os termos quadráticos da umidade e da temperatura, ambos com efeitos negativos, e o termo linear da temperatura, com efeito positivo. As interações entre as variáveis estudadas não foram estatisticamente significativas (Tabela 12).

Tabela 11. Matriz do DCCR 2³ contendo ensaios e respostas para cultivo semissólido de *A. niger* LBA02 utilizando farinha de penas e sangue como substrato para produção de lipase durante 48, 72 e 96h de fermentação.

Ensaio	Umidade (%)	Temperatura (°C)	Farelo Trigo (%)	Atividade de Lipase (U/g)		
				48 h	72 h	96 h
1	-1,00 (41)	-1,00 (24)	-1,00 (9)	18,99	74,42	105,21
2	-1,00 (41)	-1,00 (24)	+1,00 (21)	19,94	59,26	97,16
3	-1,00 (41)	+1,00 (36)	-1,00 (9)	64,94	50,26	58,79
4	-1,00 (41)	+1,00 (36)	+1,00 (21)	66,37	44,57	48,84
5	+1,00 (59)	-1,00 (24)	-1,00 (9)	29,38	89,37	123,45
6	+1,00 (59)	-1,00 (24)	+1,00 (21)	13,70	77,10	91,41
7	+1,00 (59)	+1,00 (36)	-1,00 (9)	88,00	46,42	54,60
8	+1,00 (59)	+1,00 (36)	+1,00 (21)	87,32	53,92	53,24
9	-1,68 (35)	0,00 (30)	0,00 (15)	65,83	46,05	58,09
10	+1,68 (65)	0,00 (30)	0,00 (15)	78,33	45,59	77,54
11	0,00 (50)	-1,68 (20)	0,00 (15)	14,59	22,41	94,52
12	0,00 (50)	+1,68 (40)	0,00 (15)	49,80	48,13	58,75
13	0,00 (50)	0,00 (30)	-1,68 (5)	111,85	86,14	106,82
14	0,00 (50)	0,00 (30)	+1,68 (25)	84,46	57,07	71,60
15	0,00 (50)	0,00 (30)	0,00 (15)	94,52	71,60	85,58
16	0,00 (50)	0,00 (30)	0,00 (15)	87,25	72,16	87,25
17	0,00 (50)	0,00 (30)	0,00 (15)	97,88	75,52	88,93

Tabela 12. Coeficientes de regressão do DCCR 2³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de *A. niger* LBA02 e produção de lipase após 48h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.

Fator	Coeficientes	Erro Padrão	t (7)	p-Valor
Média	94,33	10,27	9,19	<0,001
(1)Umidade (%) (L)	5,07	4,82	1,05	0,328
Umidade (%) (Q)*	-11,32	5,31	-2,13	0,070
(2)Temperatura (°C) (L)*	20,78	4,82	4,31	0,003
Temperatura (°C) (Q)*	-25,42	5,31	-4,79	0,002
(3)Farelo de Trigo (%) (L)	-4,40	4,82	-0,91	0,392
Farelo de Trigo (%) (Q)	-2,10	5,31	-0,40	0,704
1L x 2L	4,98	6,30	0,79	0,455
1L x 3L	-2,34	6,30	-0,37	0,721
2L x 3L	1,93	6,30	0,31	0,768

*Termos significativos (p-valor). L = linear; Q = quadrático

A análise de variância (ANOVA) demonstrou que a regressão foi significativa, visto que o valor de F calculado foi maior que F tabelado, e o coeficiente de múltipla correlação (R^2) foi 0,83, indicando que o modelo (Equação 2) apresentou boa capacidade de explicação dos resultados e pode ser utilizado para prever as respostas de produção de lipase de *A. niger* LBA02 nas condições de ensaio avaliadas (Tabela 13).

Tabela 13. ANOVA para determinação das condições mais adequadas de cultivo de *A. niger* LBA02 e produção de lipase após 48h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.

Fontes de variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}
Regressão	14179,54	4	3544,89	15,14
Resíduos	2810,10	12	234,17	
Total	16989,64	16		

$$\text{Atividade de Lipase} = 94,33 + 5,07(x_1) - 11,32(x_1)^2 + 20,78(x_2) - 25,42(x_2)^2 \text{ (Equação 2)}$$

$F_{0,1; 4,12}$ (F tabelado) = 2,48, $R^2 = 0,83$, p-valor = 0,0001

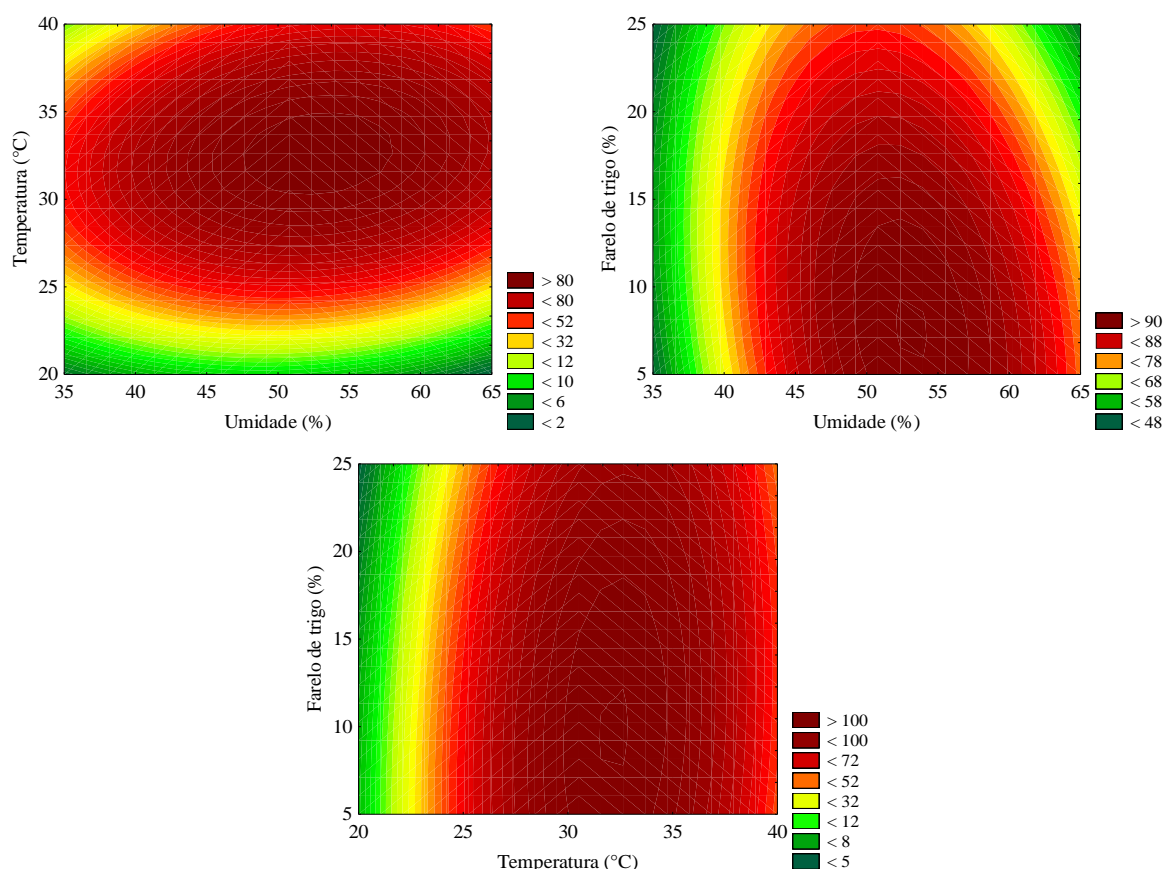


Figura 5. Curvas de contorno para a produção de lipase (U/g) por *A. niger* LBA02 após 48h de fermentação sólida utilizando farinha de penas como substrato em função das variáveis independentes umidade inicial do meio de cultivo, temperatura de incubação e suplementação do meio com farelo de trigo.

A análise das curvas de contorno para produção de lipase mostrou que os maiores valores de atividade foram detectados na região dos pontos centrais do delineamento

experimental, onde a umidade inicial foi de 50%, a temperatura de incubação de 30°C e a quantidade de farelo de trigo incorporada à farinha de penas foi de 15%. Nessas condições, a atividade de lipase foi próxima a 100 U/g. É importante ainda destacar que, assim como observado nos resultados de protease, a umidade e a temperatura foram os fatores de maior importância na síntese desta enzima por *A. niger* LBA02 (Figura 5).

Os resultados de produção de lipase mostraram comportamentos diferentes para cada tempo de fermentação. Após 48 h de fermentação, a umidade e a temperatura foram os fatores de maior importância na síntese de lipase e o pico de produção foi detectado no ponto central do DCCR, enquanto após 96 h de fermentação, a temperatura e a adição de farelo de trigo foram os fatores de maior importância na síntese de lipase. Porém, em ambos os tempos de fermentação, os maiores valores de produção de lipase obtidos foram semelhantes, próximos a 100 U/g.

Os picos de produção da lipase próximos a 100 U/g encontrados nos ensaios do DCCR não foram muito acima do encontrado na fermentação inicial realizada apenas com a farinha de pena como substrato, onde foram observadas atividades próximas a 90 U/g, embora no DCCR foram encontrados picos de produção após 48 h de fermentação enquanto na fermentação inicial realizada apenas com a farinha de pena como substrato, os valores de lipase tenham aumentado após 72 e 96 h de fermentação.

A produção de lipase em nosso estudo foi superior e obtida em menores tempos de fermentação que os valores encontrados em outros estudos de fermentação semissólida por *A. niger*. Os estudos também reforçam a importância da temperatura, da umidade e do substrato utilizado para a fermentação (Santos et al., 2012; Anusha et al., 2017 e Costa et al., 2017).

Santos et al. (2012) avaliaram os efeitos da temperatura e da umidade sobre a produção de lipase em fermentação de farinha de sementes de abóbora utilizando *A. niger*. A máxima atividade lipolítica (71,88 U/g) foi obtida utilizando umidade inicial de 30% e temperatura de 30°C em 120h de fermentação. A temperatura e a interação entre a temperatura e a umidade inicial foram os parâmetros que mais influenciaram a produção de lipase.

Costa et al. (2017) avaliaram a produção de lipase por *A. niger* em fermentação semissólida de farelo de arroz, farelo de trigo e farelo de soja com e sem suplementação de glicose, glicerol ou óleo de soja por 7 dias a 28°C e 50% de umidade inicial. Os resultados mostraram que os maiores valores de atividade de lipase foram obtidos com as misturas de farelo de arroz e glicerol (19,84 U/g) e o farelo de arroz sem suplementação (13,27 U/g).

5.2.3. Produção de Fitase

Os resultados obtidos para produção de fitase nos 17 ensaios do DCCR durante a cinética de fermentação estão apresentados na Tabela 14. Os valores variaram de 20,25 U/g (ensaio 13 após 96h de fermentação) a 117,16 U/g (ensaio 7 após 72h de fermentação). A condução do processo fermentativo durante 72h resultou em maior produção média da enzima, atingindo 76,62 U/g. Visto que somente os resultados obtidos para produção de fitase após 72h apresentaram bons ajustes estatísticos além de valores de produção satisfatórios, este tempo foi utilizado para apresentação dos efeitos, ANOVA e curvas de contorno. As Tabelas com os coeficientes de regressão para a produção de fitase após 48h e 96h de fermentação estão apresentadas no anexo C.

Tabela 14. Matriz do DCCR 2³ contendo ensaios e respostas para cultivo semissólido de *A. niger* LBA02 utilizando farinha de penas e sangue como substrato e produção de fitase durante 48, 72 e 96h de fermentação.

Ensaio	Umidade (%)	Temperatura (°C)	Farelo Trigo (%)	Atividade de Fitase (U/g)		
				48 h	72 h	96 h
1	-1,00 (41)	-1,00 (24)	-1,00 (9)	37,74	41,93	94,62
2	-1,00 (41)	-1,00 (24)	+1,00 (21)	48,24	94,58	71,87
3	-1,00 (41)	+1,00 (36)	-1,00 (9)	40,75	59,31	65,63
4	-1,00 (41)	+1,00 (36)	+1,00 (21)	88,91	52,05	56,31
5	+1,00 (59)	-1,00 (24)	-1,00 (9)	66,52	77,58	77,80
6	+1,00 (59)	-1,00 (24)	+1,00 (21)	64,99	87,76	58,85
7	+1,00 (59)	+1,00 (36)	-1,00 (9)	52,23	117,16	70,08
8	+1,00 (59)	+1,00 (36)	+1,00 (21)	60,61	96,08	78,07
9	-1,68 (35)	0,00 (30)	0,00 (15)	94,86	55,36	80,95
10	+1,68 (65)	0,00 (30)	0,00 (15)	36,94	95,17	80,62
11	0,00 (50)	-1,68 (20)	0,00 (15)	53,11	71,69	58,45
12	0,00 (50)	+1,68 (40)	0,00 (15)	87,36	83,05	62,90
13	0,00 (50)	0,00 (30)	-1,68 (5)	79,69	68,82	20,25
14	0,00 (50)	0,00 (30)	+1,68 (25)	24,96	58,72	79,51
15	0,00 (50)	0,00 (30)	0,00 (15)	57,24	72,23	87,81
16	0,00 (50)	0,00 (30)	0,00 (15)	60,74	84,85	87,68
17	0,00 (50)	0,00 (30)	0,00 (15)	58,18	86,11	96,43

Após 72 h de fermentação, o fator que apresentou efeito estatisticamente significativo ($p \leq 0,10$) para a produção de fitase foi o termo linear da umidade com efeito positivo. Todas as interações entre as variáveis estudadas também foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,10$), sendo a interação da umidade x temperatura com efeito positivo, e a interação da umidade x farelo de trigo e a interação da temperatura x farelo de trigo com efeitos negativos (Tabela 15).

Tabela 15. Coeficientes de regressão do DCCR 2³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de *A. niger* LBA02 e produção de fitase após 72h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.

Fator	Coefficientes	Erro Padrão	t (7)	p-Valor
Média	80,63	5,38	15,00	<0,001
(1)Umidade (%) (L)*	14,47	2,52	5,73	<0,001
Umidade (%) (Q)	-0,56	2,78	-0,20	0,846
(2)Temperatura (°C) (L)	3,07	2,52	1,21	0,264
Temperatura (°C) (Q)	0,19	2,78	0,07	0,949
(3)Farelo de Trigo (%) (L)	1,28	2,52	0,51	0,627
Farelo de Trigo (%) (Q)	-4,62	2,78	-1,66	0,140
1L x 2L*	9,13	3,30	2,77	0,028
1L x 3L*	-7,04	3,30	-2,13	0,070
2L x 3L*	-11,40	3,30	-3,46	0,011

*Termos significativos (p-valor). L = linear; Q = quadrático

A análise de variância (ANOVA) dos resultados de 72 h de fermentação demonstrou que a regressão foi significativa, visto que o valores de F calculado foi maior que o valor de F tabelado, e o coeficiente de múltipla correlação (R^2) foi 83%, indicando que o modelo foi capaz de explicar a variação dos resultados e o modelo proposto (Equação 3) pode ser utilizado para prever as respostas de produção de fitase de *A. niger* LBA02 nas condições de ensaio avaliadas (Tabela 16).

Tabela 16. ANOVA para determinação das condições mais adequadas de cultivo de *A. niger* LBA02 e produção de fitase após 72h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.

Fator	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}
Regressão	4963,76	4	1240,94	14,41
Resíduos	1033,47	12	86,12	
Total	5997,23	16		

$$\text{Atividade de Fitase} = 80,63 + 14,47 (x_1) + 9,13 (x_1 x_2) - 7,04 (x_1 x_3) - 11,40 (x_2 x_3) \text{ (Equação 3)}$$

$F_{0,1; 4,12}$ (F tabelado) = 2,48, R^2 = 0,83, p-valor = 0,0002

A análise das curvas de contorno para produção de fitase após 72 h de fermentação mostrou que os maiores valores de atividade de fitase foram detectados nos pontos de maior umidade inicial (59-65%); maior temperatura de incubação (30-36°C) e quantidades intermediárias de farelo de trigo incorporada à farinha de penas de frango (9-21%). Nessas condições, a atividade de fitase foi próxima a 90 U/g (Figura 6).

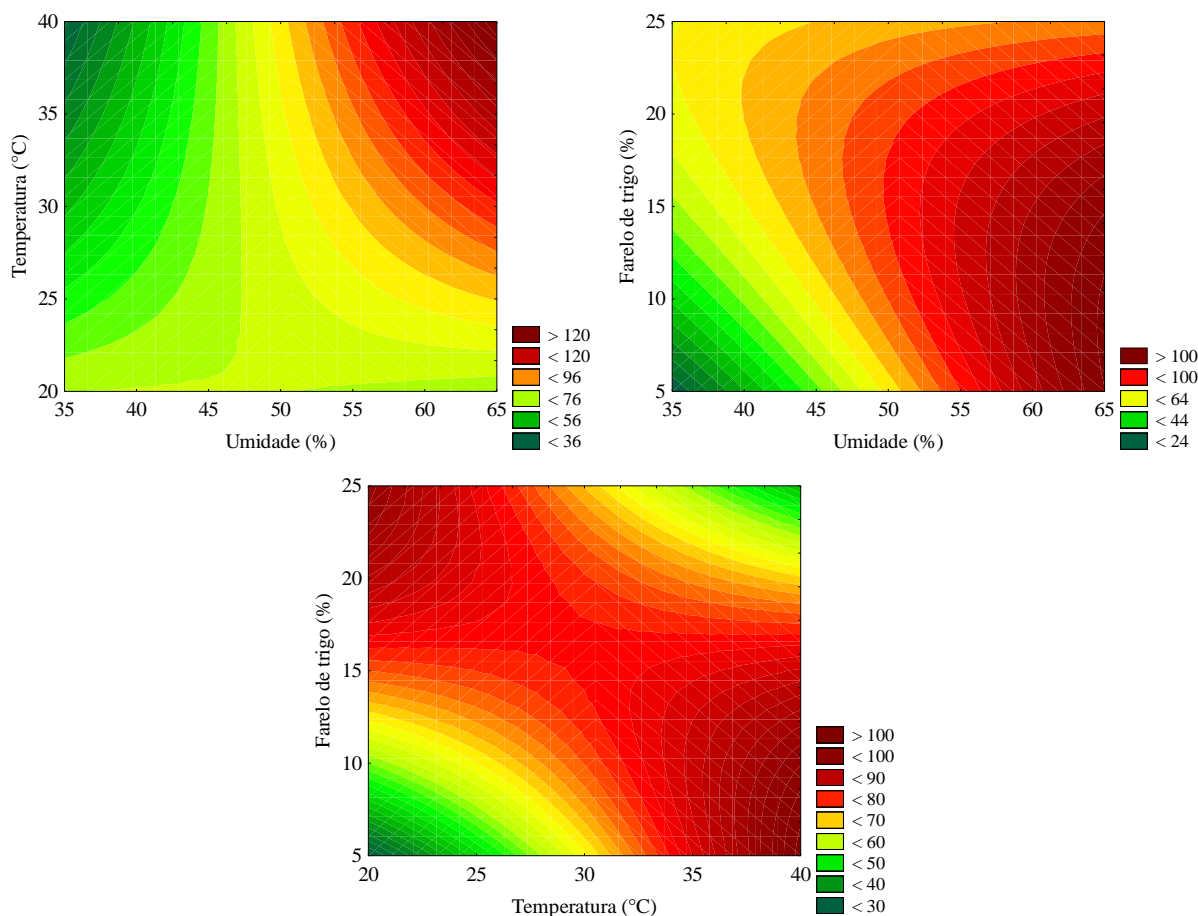


Figura 6. Curvas de contorno para a produção de fitase (U/g) por *A. niger* LBA02 após 72h de fermentação sólida utilizando farinha de penas como substrato em função das variáveis independentes umidade inicial do meio de cultivo, temperatura de incubação e suplementação do meio com farelo de trigo.

Os picos de produção de fitase próximos a 90 U/g encontrados nos ensaios do DCCR foram muito acima dos encontrados na fermentação inicial realizada apenas com a farinha de penas como substrato, onde as atividades variaram entre 20 e 40 U/g e próximos a resultados encontrados em estudos de fermentação semissólida por outras linhagens de *A. niger*. Os estudos também reforçam a importância da umidade e da suplementação do meio de cultivo para melhorar os índices de produção (Bhavsar et al., 2012; Gunashree et al., 2008).

Bhavsar et al. (2011) compararam a produção de fitase em diferentes substratos (torta de amendoim, torta de coco, torta de algodão, farelo de arroz e farelo de trigo) por 7 dias de fermentação semissólida utilizando a linhagem de *A. niger* NCIM 563. Os resultados iniciais do estudo mostraram que as maiores atividades de fitase foram alcançadas utilizando o farelo de trigo como substrato (50 U/g), sendo este selecionado para os estudos de otimização utilizando uma estratégia sequencial de delineamentos experimentais (Placket-Burman e Box-Behnken). Os efeitos de 11 variáveis independentes foram avaliados a após a otimização, a

produção de fitase aumentou de 50 U/g após 7 dias a 30°C para 154 U/g após 4 dias a 30°C, um ganho considerável na produtividade. As variáveis com impactos significativos sobre a produção de fitase foram a umidade inicial do meio de cultivo e a suplementação do meio com fontes de carbono (glicose, dextrina), de nitrogênio (NaNO_3) e com sais (MgSO_4).

Gunashree et al. (2008) avaliaram o efeito da suplementação de farelo de trigo com vários ingredientes (fontes de carbono, de nitrogênio, de fosfatos inorgânicos, de surfactantes e de metais) para produção de fitase por *A. niger* CFR335 em fermentação semissólida e submersa a 30°C por 5 dias. As variáveis com impactos significativos para a produção de fitase foram a adição de sacarose para ambas as fermentações, adição de NaH_2PO_4 para fermentação semissólida e adição de peptonas, Tween-20 e CaCl_2 na fermentação submersa. Os maiores valores de fitase foram detectados no meio suplementado com sacarose que apresentou 14,2 U/mL no extrato obtido por fermentação submersa e 73 U/g para o extrato produzido por fermentação semissólida.

5.2.4. Produção de Queratinase

Os resultados obtidos para produção de queratinase nos 17 ensaios do DCCR durante a cinética de fermentação estão apresentados na Tabela 17. Os valores variaram de 0,50 U/g (ensaio 3 após 72h de fermentação) a 31,60 U/g (ensaio 5 após 72h de fermentação). Após 72h de fermentação, a produção média de queratinase para os 17 ensaios foi de 11,05 U/g, sendo este o melhor valor médio de produção.

As análises estatísticas indicaram que os modelos obtidos não foram capazes de explicar de forma satisfatória as variações dos resultados, não podendo ser utilizados para prever as respostas de produção de queratinase por *A. niger* LBA02 nas condições de ensaio avaliadas (48, 72 e 96 h de fermentação). As Tabelas contendo as análises de efeitos e os coeficientes de regressão para produção de queratinase durante 48, 72 e 96h estão apresentadas no anexo D.

Embora os resultados de produção de queratinase possam parecer baixos se comparados às demais enzimas, os valores são satisfatórios visto que a produção de queratinase por cepas de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são raramente reportadas e que o tempo de fermentação foi inferior aos outros estudos de fermentação semissólida utilizando *A. niger*. Os estudos indicam diferenças de resultados entre as diferentes linhagens, diferentes substratos, e também mostram que a fermentação semissólida apresenta melhores resultados que a fermentação submersa (Mazotto et al., 2013; Lopes et al., 2011).

Tabela 17. Matriz do DCCR 2³ contendo ensaios e respostas para cultivo semissólido de *A. niger* LBA02 utilizando farinha de penas e sangue como substrato e produção de queratinase durante 48, 72 e 96h de fermentação.

Ensaio	Umidade (%)	Temperatura (°C)	Farelo Trigo (%)	Atividade de Queratinase (U/g)		
				48 h	72 h	96 h
1	-1,00 (41)	-1,00 (24)	-1,00 (9)	14,38	21,25	1,58
2	-1,00 (41)	-1,00 (24)	+1,00 (21)	4,94	12,71	7,87
3	-1,00 (41)	+1,00 (36)	-1,00 (9)	5,27	0,50	0,82
4	-1,00 (41)	+1,00 (36)	+1,00 (21)	2,86	11,67	3,61
5	+1,00 (59)	-1,00 (24)	-1,00 (9)	1,37	31,60	2,24
6	+1,00 (59)	-1,00 (24)	+1,00 (21)	4,88	7,62	7,28
7	+1,00 (59)	+1,00 (36)	-1,00 (9)	13,55	4,20	1,88
8	+1,00 (59)	+1,00 (36)	+1,00 (21)	4,92	6,34	2,26
9	-1,68 (35)	0,00 (30)	0,00 (15)	20,68	7,18	8,15
10	+1,68 (65)	0,00 (30)	0,00 (15)	6,30	3,48	5,79
11	0,00 (50)	-1,68 (20)	0,00 (15)	12,69	4,60	17,36
12	0,00 (50)	+1,68 (40)	0,00 (15)	6,74	4,32	2,11
13	0,00 (50)	0,00 (30)	-1,68 (5)	1,63	1,76	8,40
14	0,00 (50)	0,00 (30)	+1,68 (25)	11,18	3,38	6,38
15	0,00 (50)	0,00 (30)	0,00 (15)	12,70	13,67	11,06
16	0,00 (50)	0,00 (30)	0,00 (15)	9,20	15,34	12,90
17	0,00 (50)	0,00 (30)	0,00 (15)	14,53	14,67	11,76

Mazotto et al. (2013) estudaram 28 linhagens de *Aspergillus niger*, e relataram que 4 linhagens apresentaram melhores desempenhos na produção de queratinase, em especial a linhagem de *A. niger* 3T5B8. Essa linhagem apresentou atividade de queratinase de 172,7 U/mL após 7 dias em fermentação semissólida, um resultado 7 vezes maior do que a mesma linhagem em fermentação submersa. Dentre as 4 principais linhagens avaliadas, o micro-organismo *A. niger* 9D40 foi o que apresentou o menor desempenho de produção com atividade de 21,3 U/mL após 4 dias em fermentação submersa.

Lopes et al. (2011) avaliaram a produção de queratinases por *Aspergillus niger* utilizando diferentes substratos (cabelo humano, pêlos de porco, penas de frango, farinha de penas e chifre bovino) e relataram que a farinha de penas foi o substrato que permitiu a maior síntese da enzima pelo micro-organismo. O pico de atividade enzimática foi de 1,73 U/mL após 48 h de fermentação com uma concentração de substrato de 20 g/L e pH 7,8.

5.3. Cinética de produção das enzimas hidrolíticas

A cinética de produção das enzimas por *A. niger* LBA02 foi realizada com os parâmetros do ponto central do DCCR, ou seja, farinha de penas de frango como 35% do meio de cultivo, farelo de trigo como 15%, umidade inicial de 50% e temperatura de incubação de 30°C. Os resultados obtidos para a cinética estão apresentados na Figura 7.

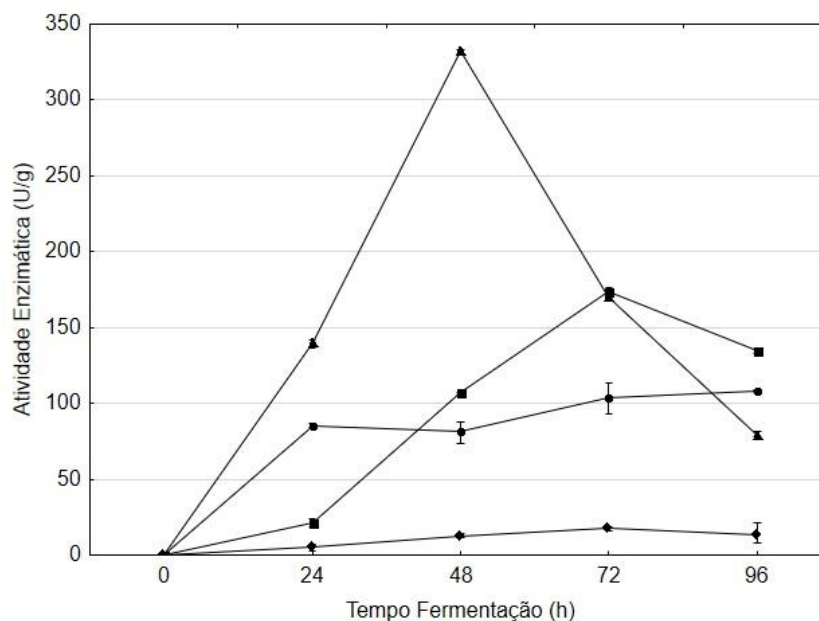


Figura 7. Produção de protease (▲), lipase (■), fitase (●) e queratinase (◆) por *A. niger* LBA02 durante cinética de fermentação de 96h utilizando farinha de penas e sangue suplementada com farelo de trigo nas condições selecionadas como mais adequadas no DCCR.

A cinética de produção das enzimas hidrolíticas por *A. niger* LBA02 em fermentação semissólida mostrou um perfil distinto para cada enzima avaliada. De forma geral, os valores máximos de atividade enzimática foram detectados entre 48 e 72h de fermentação. A produção máxima de protease foi de 331,87 U/g após 48h de fermentação, as enzimas lipase e queratinase apresentaram picos de produção de 173,90 U/g e 17,38 U/g, respectivamente, após 72h de fermentação, enquanto a produção de fitase não apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) nos valores de atividade enzimática máximos detectados de 103,77 U/g e 108,22 U/g após 72 e 96h de fermentação, respectivamente.

Diante dos resultados obtidos e levando em consideração a produtividade simultânea das enzimas, o tempo de 48h foi selecionado para obtenção do extrato enzimático bruto e concentração para posterior caracterização bioquímica.

5.4. Determinação das condições de pH e temperatura para máxima atividade das enzimas

5.4.1. Atividade de protease

Os resultados obtidos para atividade de protease nos 11 ensaios do DCCR em função dos parâmetros pH e temperatura estão apresentados na Tabela 18. Os valores variaram de 45,4 U/g (ensaio 4) a 5683,3 U/g (ensaio 10), com máxima atividade detectada em pH 5,5 e 50°C.

Os fatores que apresentaram efeito estatisticamente significativos ($p \leq 0,10$) para a atividade de protease foram os termos linear e quadrático do pH e o termo quadrático da temperatura. Adicionalmente, os efeitos negativos observados para estes parâmetros indicaram que o aumento dos valores de pH e temperatura resultaram em diminuição da atividade da enzima (Tabela 19). Valores altos de atividade de protease em valores inferiores de pH, independente da temperatura, demonstraram que as proteases produzidas por *A. niger* LBA02 podem ser classificadas como ácidas.

Tabela 18. Matriz do DCCR 2² contendo os níveis das variáveis independentes e respectivas respostas para atividade de protease do extrato enzimático concentrado de *A. niger* LBA02 em função da combinação dos parâmetros pH e temperatura.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade de Protease (U/g)
1	-1,0 (3,0)	-1,0 (39,4)	4930,42
2	-1,0 (3,0)	+1,0 (60,6)	4007,92
3	+1,0 (8,0)	-1,0 (39,4)	255,42
4	+1,0 (8,0)	+1,0 (60,6)	45,42
5	-1,41 (2,0)	0,0 (50,0)	2155,83
6	+1,41 (9,0)	0,0 (50,0)	145,42
7	0,0 (5,5)	-1,41 (35,0)	4181,67
8	0,0 (5,5)	+1,41 (65,0)	3872,08
9	0,0 (5,5)	0,0 (50,0)	5643,33
10	0,0 (5,5)	0,0 (50,0)	5683,33
11	0,0 (5,5)	0,0 (50,0)	5656,25

Tabela 19. Coeficientes de regressão do DCCR 2² para determinação das condições de pH e temperatura para atividade de protease do extrato enzimático concentrado de *A. niger* LBA02.

Fator	Coeficientes	Erro Padrão	t (7)	p-Valor
Média*	5660,97	542,44	10,44	<0,001
(1)pH (L)*	-1435,08	332,17	-4,32	0,008
pH (Q)*	-2324,91	395,37	-5,88	0,002
(2)Temperatura (°C) (L)	-196,29	332,17	-0,59	0,580
Temperatura (°C) (Q)*	-886,79	395,37	-2,24	0,075
1L x 2L	178,13	469,77	0,38	0,720

*Termos significativos ($p\text{-valor} \leq 0,10$). L = linear; Q = quadrático

A análise de variância (ANOVA) demonstrou que a regressão foi significativa, visto que o valor de F calculado foi maior que F tabelado e o coeficiente de múltipla correlação (R^2) foi 0,91, indicando que o modelo (equação 4) apresentou boa capacidade de explicação da variação dos resultados e pode ser utilizado para prever as respostas de atividade de protease nas condições de ensaio avaliadas (Tabela 20).

Tabela 20. ANOVA para o DCCR no estudo de determinação das condições mais adequadas de atividade de protease do extrato enzimático concentrado de *A. niger* LBA02.

Fator	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}
Regressão	47562251,83	4	11890562,96	15,71
Resíduos	4540505,24	6	756750,87	
Total	52102757,07	10		
$Atividade\ de\ Protease = 5660.97 - 1435.08(x_1) - 2324.91(x_1)^2 - 196.29(x_2) - 886.79(x_2)^2$ (Equação 4)				
$F_{0,1; 4,6}$ (F tabelado) = 3,18, $R^2 = 0,91$, p-valor = 0,0025				

A análise da curva de contorno para atividade de protease mostrou que os maiores valores foram detectados na região dos pontos centrais do DCCR, com valores de pH entre 4,5 e 5,0 e a temperatura no intervalo de 45 a 50°C. Nessas condições, a atividade de protease foi superior a 5000 U/g (Figura 8).

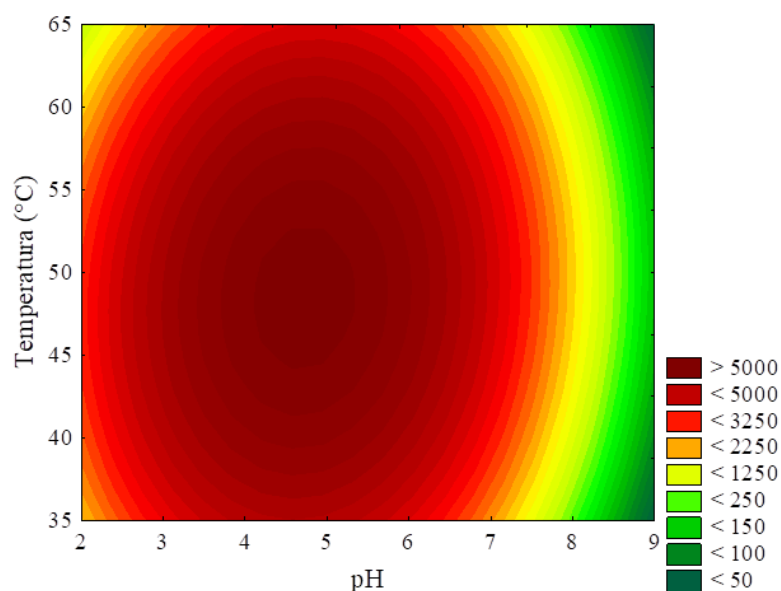


Figura 8. Curva de contorno para atividade de protease (U/g) do extrato enzimático concentrado de *A. niger* LBA02 obtido em fermentação semissólida de farinha de penas.

O resultado obtido neste trabalho foi semelhante ao reportado por De Castro et al. (2014). Estes autores avaliaram as características bioquímicas de proteases produzidas pela mesma linhagem de *A. niger* LBA02 em fermentação semissólida de três diferentes substratos (farelos de trigo, de soja e de algodão) sob as mesmas condições de umidade (50%) e temperatura (30°C). Em geral, as proteases também apresentaram maiores atividades em meio ácido pH de 2,0 a 5,0. As proteases resultantes da fermentação de farelo de soja e farelo de algodão apresentaram maior atividade em pH 3,5-4,5 e temperaturas de 45–55°C, enquanto a enzima produzida em farelo de trigo apresentou maior atividade no intervalo de pH de 2,0 a 4,5 e temperaturas entre 45 e 60°C.

5.4.2. Atividade de lipase

Os resultados para atividade de lipase nos 11 ensaios do DCCR estão apresentados na Tabela 21. Os valores variaram de 503,26 U/g (ensaio 4) a 2515,62 U/g (ensaio 2), onde os valores máximos foram detectados na faixa ácida de pH e temperaturas entre 50 e 60°C.

Tabela 21. Matriz do DCCR 2² contendo os níveis das variáveis independentes e respectivas respostas para atividade de lipase do extrato enzimático concentrado de *A. niger* LBA02 em função da combinação dos parâmetros pH e temperatura.

Ensaios	pH	Temperatura (°C)	Atividade de Lipase (U/g)
1	-1,0 (3,0)	-1,0 (39,4)	1928,68
2	-1,0 (3,0)	+1,0 (60,6)	2515,62
3	+1,0 (8,0)	-1,0 (39,4)	1677,14
4	+1,0 (8,0)	+1,0 (60,6)	503,26
5	-1,41 (2,0)	0,0 (50,0)	2096,38
6	+1,41 (9,0)	0,0 (50,0)	1104,18
7	0,0 (5,5)	-1,41 (35,0)	1551,37
8	0,0 (5,5)	+1,41 (65,0)	1663,16
9	0,0 (5,5)	0,0 (50,0)	1774,96
10	0,0 (5,5)	0,0 (50,0)	1747,01
11	0,0 (5,5)	0,0 (50,0)	1733,04

Os fatores que apresentaram efeito estatisticamente significativos ($p \leq 0,10$) para a atividade de lipase foram os termos linear do pH e a interação entre as variáveis pH x temperatura (Tabela 22).

Tabela 22. Coeficientes de regressão do DCCR 2² para determinação das condições de pH e temperatura para atividade de lipase do extrato enzimático concentrado de *A. niger* LBA02.

Fator	Coeficientes	Erro Padrão	t (7)	p-Valor
Média	1751,67	105,95	16,53	<0,001
(1)pH (L)*	-458,39	64,88	-7,06	0,001
pH (Q)	-62,60	77,23	-0,81	0,454
(2)Temperatura (°C) (L)	-53,60	64,88	-0,83	0,446
Temperatura (°C) (Q)	-59,10	77,23	-0,77	0,479
1L x 2L*	-440,20	91,76	-4,80	0,005

*Termos significativos (p-valor $\leq 0,10$). L = linear; Q = quadrático

A análise de variância (ANOVA) demonstrou que a regressão foi significativa, visto que o valor de F calculado foi maior que o F tabelado, e o coeficiente de múltipla correlação (R^2) foi 92%, indicando que o modelo (equação 5) foi capaz de explicar a variação dos resultados e pode ser utilizado para prever as respostas de atividade de lipase nas condições de ensaio avaliadas (Tabela 23).

Tabela 23. ANOVA para o DCCR no estudo de determinação das condições mais adequadas de atividade de lipase do extrato enzimático concentrado de *A. niger* LBA02.

Fator	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calc}
Regressão	2456065,73	2	1228032,87	43,91
Resíduos	223742,91	8	27967,86	
Total	2679808,64	10		

$$\text{Atividade de Lipase} = 1751.67 - 458.39(x_1) - 62.60(x_1)^2 - 440.20(x_1x_2) \text{ (Equação 5)}$$

$F_{0,1; 4,6}$ (F tabelado) = 3,11, $R^2 = 0,92$, p-valor = 0,0001

A análise da curva de contorno para atividade de lipase mostrou que os maiores valores foram detectados na região de pH ácido (2 a 3) e temperaturas superiores a 50°C, embora a influência do pH tenha apresentado maior impacto. Nessas condições, a atividade de lipase foi superior a 2000 U/g. (Figura 9).

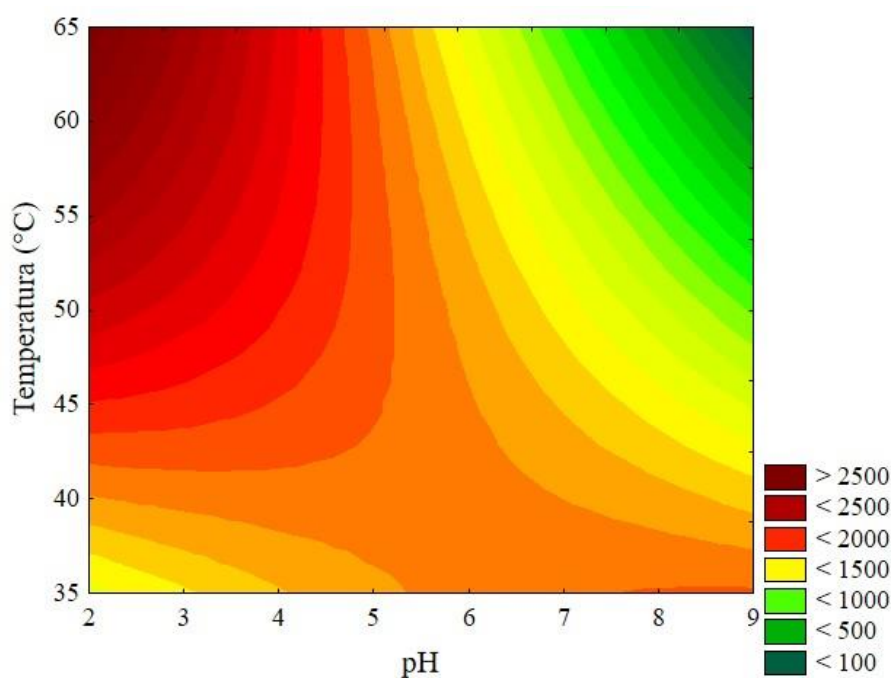


Figura 9. Curva de contorno para atividade de lipase (U/g) do extrato enzimático concentrado de *A. niger* LBA02 obtido em fermentação semissólida.

Resultado semelhante foi reportado por Mahadik et al. (2002). Estes autores avaliaram a produção de lipase por *A. niger* NCIM 1207 em processos fermentativos semissólido e submerso e observaram que a lipase produzida apresentou condições ótimas de atividade em pH 2,5 e temperatura de 45°C.

5.4.3. Atividade de fitase

Os resultados obtidos para atividade de fitase nos 11 ensaios do DCCR estão apresentados na Tabela 24. Os valores variaram de 1162,29 U/g (ensaio 6) a 4844,44 U/g (ensaio 2), onde os valores máximos foram detectados em baixo pH 2-3 e temperaturas entre 50 e 60°C.

Tabela 24. Matriz do DCCR 2² contendo os níveis das variáveis independentes e respectivas respostas para atividade de fitase do extrato enzimático concentrado de *A. niger* LBA02 em função da combinação dos parâmetros pH e temperatura.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade de Fitase (U/g)
1	-1,0 (3,0)	-1,0 (39,4)	2716,50
2	-1,0 (3,0)	+1,0 (60,6)	4844,44
3	+1,0 (8,0)	-1,0 (39,4)	3074,75
4	+1,0 (8,0)	+1,0 (60,6)	3400,67
5	-1,41 (2,0)	0,0 (50,0)	4390,57
6	+1,41 (9,0)	0,0 (50,0)	1162,29
7	0,0 (5,5)	-1,41 (35,0)	1442,42
8	0,0 (5,5)	+1,41 (65,0)	1652,53
9	0,0 (5,5)	0,0 (50,0)	2443,10
10	0,0 (5,5)	0,0 (50,0)	1931,31
11	0,0 (5,5)	0,0 (50,0)	2145,45

A avaliação dos efeitos indicou que, no intervalo avaliado, nenhuma das variáveis apresentou efeito estatisticamente significativo ($p \leq 0,10$) para atividade de fitase (Tabela 25). Embora não tenha sido obtido modelo matemático adequado para prever as respostas de fitase, pela análise pontual dos ensaios realizados, ficou evidenciado que os maiores valores de atividade enzimática foram detectados em pH ácido de 2 a 3 e temperaturas de 50 a 60°C, condições estas semelhantes para as enzimas protease e lipase.

Tabela 25. Coeficientes de regressão do DCCR 2² para determinação das condições de pH e temperatura para atividade de fitase do extrato enzimático concentrado de *A. niger* LBA02.

Fator	Coeficientes	Erro Padrão	t (7)	p-Valor
Média*	2173,29	624,87	3,48	0,018
(1)pH (L)	-706,38	382,65	-1,85	0,124
pH (Q)	638,36	455,45	1,40	0,220
(2)Temperatura (°C) (L)	343,88	382,65	0,90	0,410
Temperatura (°C) (Q)	23,88	455,45	0,05	0,960
1L x 2L	-450,51	541,15	-0,83	0,443

*Termos significativos (p-valor $\leq 0,10$). L = linear; Q = quadrático

Bhavsar et al. (2011) avaliaram as fitases produzidas por *A. niger* NCIM 563 em fermentação semissólida de diferentes substratos (torta de amendoim, torta de coco, torta de algodão, farelo de arroz e farelo de trigo) e encontraram maiores valores de atividade em 55°C pH próximo a 6,0.

Porém, em outro estudo com a mesma linhagem de *A. niger* NCIM 563, Bhavsar et al. (2013) purificaram e caracterizaram isômeros das fitases produzidas em fermentação semissólida (Phy 3 e Phy 4) e fermentação submersa (Phy 1 e Phy 2) utilizando farelo de trigo como substrato. Após caracterização bioquímica, detectaram maiores atividades para Phy 1 e Phy 4 em pH 2,5, enquanto Phy 2 e Phy 3 em valores de pH de 5,0 a 5,6. As fitases Phy 1, 3 e 4 apresentaram uma especificidade muito ampla de substratos, enquanto Phy 2 foi mais específico para fitato de sódio. Phy 1 e 2 (fermentação submersa) mostraram homologia com outras fitases conhecidas, mas Phy 3 e 4 (fermentação semissólida) não mostraram nenhuma homologia com outras fitases conhecidas, sugerindo sua natureza única. O estudo concluiu ainda que as características bioquímicas exclusivas e a aplicação multinível de fitases obtidas em fermentação semissólida apresentam eficácia e grande potencial.

A produção de isômeros de fitase com diferentes características em fermentação semissólida por *A. niger* pode explicar o fato de modelo não ser significativo estatisticamente, e também as diferenças de atividade em função do pH.

Novelli et al. (2017) avaliaram a atividade de fitase produzida por *A. niger* em fermentação semissólida de farelo de trigo e farelo de soja, e também obtiveram fitases com caráter ácido e pH ótimo em torno de 5,0.

5.4.4. Atividade de queratinase

Os resultados para atividade de queratinase nos 11 ensaios do DCCR estão apresentados na Tabela 26. Os valores variaram de 34,00 U/g (ensaio 7) a 440,22 U/g (ensaio 2).

Tabela 26. Matriz do DCCR 2² contendo os níveis das variáveis independentes e respectivas respostas para atividade de queratinase do extrato enzimático concentrado de *A. niger* LBA02 em função da combinação dos parâmetros pH e temperatura.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	Atividade de Queratinase (U/g)
1	-1,0 (3,0)	-1,0 (39,4)	48,00
2	-1,0 (3,0)	+1,0 (60,6)	440,22
3	+1,0 (8,0)	-1,0 (39,4)	392,67
4	+1,0 (8,0)	+1,0 (60,6)	410,44
5	-1,41 (2,0)	0,0 (50,0)	227,56
6	+1,41 (9,0)	0,0 (50,0)	165,11
7	0,0 (5,5)	-1,41 (35,0)	34,00
8	0,0 (5,5)	+1,41 (65,0)	293,11
9	0,0 (5,5)	0,0 (50,0)	209,78
10	0,0 (5,5)	0,0 (50,0)	266,44
11	0,0 (5,5)	0,0 (50,0)	275,33

Tabela 27. Coeficientes de regressão do DCCR 2² para determinação das condições de pH e temperatura para atividade de queratinase do extrato enzimático concentrado de *A. niger* LBA02.

Fator	Coeficientes	Erro Padrão	t (7)	p-Valor
Média	257,93	71,66	3,60	0,016
(1)pH (L)	40,21	43,88	0,92	0,402
pH (Q)	6,31	52,23	0,12	0,908
(2)Temperatura (°C) (L)*	89,09	43,88	2,03	0,098
Temperatura (°C) (Q)	-15,63	52,23	-0,30	0,777
1L x 2L	-93,61	62,06	-1,51	0,192

*Termos significativos (p-valor $\leq 0,10$). L = linear; Q = quadrático

A avaliação dos efeitos indicou que, no intervalo avaliado, somente o termo linear da temperatura apresentou efeito estatisticamente significativo ($p \leq 0,10$) para atividade de queratinase (Tabela 27). Desta forma, não foi possível obter um modelo matemático adequado para prever as respostas de queratinase. No entanto, pela análise pontual dos ensaios realizados, os maiores valores de atividade enzimática foram detectados nos valores de pH 3 e 8 na temperatura de 60,6°C.

Não existem muitos estudos descrevendo a produção de queratinase pelo gênero *Aspergillus*. Lopes et al. (2011) avaliaram queratinases produzidas por *Aspergillus niger* utilizando diferentes substratos e o pH ótimo encontrado foi 6,5. Outra queratinase reportada na literatura produzida por um fungo filamentosos do gênero *Aspergillus* apresentou pH ótimo de 8,0 para *A. oryzae* (Frag & Hassan, 2004).

A maioria dos trabalhos indicou que as bactérias do gênero *Bacillus* são fontes importantes de enzimas queratinolíticas, e apresentam atividade máxima em pH básico e temperaturas entre 50 e 70°C. Gegeckas et al. (2018) purificaram e caracterizaram duas queratinases produzidas por *Bacillus spp.* (BPKer e BAKer.) que apresentaram maiores atividades nas condições em temperatura de 50°C e pH 10,0 e 8,0, respectivamente. Hamiche et al. (2019) também purificaram e caracterizaram duas queratinases produzidas por *Bacillus amyloliquefaciens* S13 (KERZT-A e KERZT-B), a primeira apresentou atividade máxima nas condições de 70°C e pH 11,0, e a segunda na temperatura de 50°C e pH 6,5. Tiwary & Gupta (2010) avaliaram a queratinase produzida por *Bacillus licheniformis* ER-15 e obtiveram a condição ótima em temperatura de 70°C e pH 11,0.

Outra queratinase produzida por *E. coli* BL21 (DE3) apresentou atividade ótima nas condições de 55°C e pH 10,0 (Su et al., 2017).

5.5. Digestibilidade da farinha de pena

Os resultados comparativos das análises de proteína bruta e de digestibilidade de proteína em pepsina 0,02% para o meio de cultivo composto por farinha de penas (35%) adicionado de farelo de trigo (15%) e umidade inicial de 50% e o mesmo meio de cultivo após 48 h de fermentação pelo *A. niger* LBA02 a 30°C estão apresentados na Figura 10.

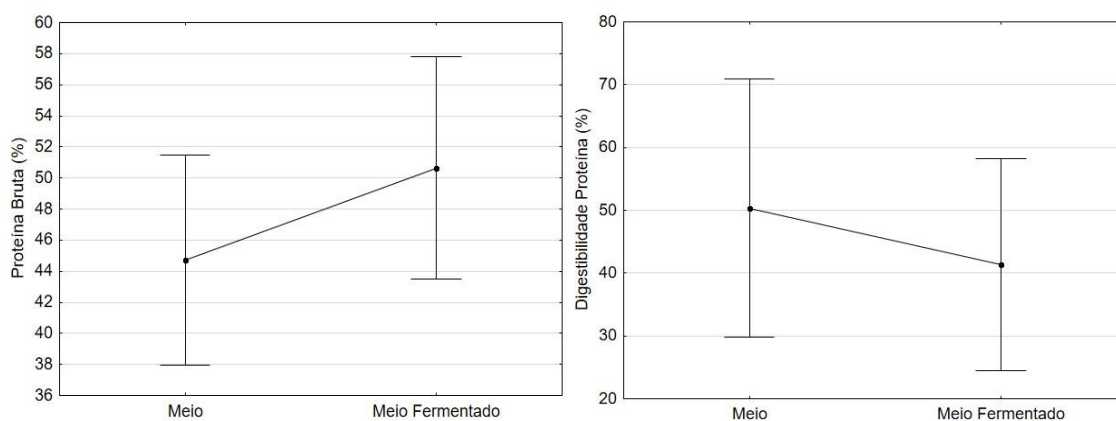


Figura 10. Comparativo dos resultados de proteína bruta (%) e digestibilidade de proteína em pepsina 0,02% (%) entre o meio de cultivo de farinha de penas e farelo de trigo e o mesmo meio após 48h de fermentação por *A. niger* LBA02.

Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$), entre os resultados de proteína bruta e de digestibilidade do meio de cultura antes e após a fermentação, assim não é possível inferir sobre a digestão das proteínas pelo *A. niger* LBA02 durante o processo fermentativo.

A média de proteína bruta apresentou aumento de 44,7% para 50,7% após a fermentação, podendo ser explicada pelo crescimento e aumento da biomassa fúngica. Entretanto, a média de digestibilidade em pepsina apresentou redução de 50,3% para 41,4%.

Os dados históricos da empresa que cedeu a amostra para o presente trabalho demonstraram que os valores de digestibilidade em pepsina para a farinha de penas são bastante variáveis (de 40,4% até 61,5%). Estudos confirmaram essa variação de digestibilidade em farinhas de penas comerciais: Maciel et al. (2017) relataram 67,3%, Eaksuree et al. (2016) obtiveram 70% e Bertsch & Coello (2005) utilizaram uma farinha com 87% de digestibilidade.

As variações são bem mais amplas quando comparadas com as penas cruas antes do processo de cozimento. Latshaw et al. (1994) avaliaram a digestibilidade em pepsina de penas cruas (16%) e de 4 farinhas de penas com diferentes processos de produção e encontraram valores que variaram de 65,8 a 80,6%. Zhang et al. (2014) avaliaram processo de produção de farinha de penas por explosão de vapor com variações de 0,5 a 2,5 MPa, obtendo elevação da digestibilidade de 10,6% da pena crua até 91% de digestibilidade obtido nas condições ótimas de 1,8 MPa por 1 min.

A qualidade e a digestibilidade da proteína dessas farinhas dependem basicamente da pressão, temperatura e do tempo de cozimento e secagem no processo de obtenção (Eyng et al., 2012).

Embora a média de digestibilidade tenha apresentado redução nos valores médios, ao contrário do que se desejava, este fato não significa que o meio fermentado não apresente melhores características nutricionais que o meio não fermentado. Assim, recomenda-se a realização de testes *in vivo* que pudessem avaliar o impacto das enzimas produzidas e o potencial probiótico do fungo filamentosso no crescimento dos frangos.

Eaksuree et al. (2016) avaliaram a digestibilidade *in vitro* e *in vivo* das proteínas de farinhas de penas tratadas com queratinases. Os resultados mostraram que a farinha de penas não tratada com enzimas foi a que apresentou a maior digestibilidade *in vitro* (70%), não tendo diferença significativa para a farinha tratada com uma enzima comercial (68%), e com diferença significativa em relação a outros três outros tratamentos com enzimas estudadas (k6, k82 e k6k82) que apresentaram respectivamente 60%, 61% e 63% de digestibilidade *in vitro* (em pepsina). Entretanto, os tratamentos com enzimas k6 e k82 foram os que apresentaram melhores resultados com diferença significativa de retenção aparente de nitrogênio nos testes *in vivo*,

indicando um efeito positivo na qualidade nutricional da proteína da farinha de pena tratada com as enzimas.

Bertsch & Coello (2005) compararam a digestibilidade em pepsina de penas cruas, farinha de pena comercial e penas hidrolisadas por *Kocuria rosea*. Os resultados demonstraram que ambas as amostras apresentaram diferença de digestibilidade em relação às penas cruas (26%), porém não houve diferença da digestibilidade da farinha de pena comercial (87%) e das penas hidrolisadas (88%).

Maciel et al. (2017) compararam a digestibilidade em pepsina de farinha de penas e penas bioconvertidas por *Chryseobacterium sp.* kr6 e *Bacillus sp.* kr16. Os resultados demonstraram que as penas fermentadas apresentaram aumento na digestibilidade, passando de 67,3% (farinha não fermentada) para 79,1% e 70,1% de digestibilidade, respectivamente, para os produtos obtidos após bioconversão por *Chryseobacterium sp.* kr6 e *Bacillus sp.* kr16.

6. Conclusão

O estudo confirmou o potencial do *A. niger* LBA02 para a obtenção de uma farinha de penas fermentada rica em enzimas exógenas e com possibilidade de uso em rações de frango, uma vez que houve produção de enzimas com benefícios reconhecidos no desempenho de crescimento das aves, principalmente proteases e fitases.

Os maiores valores de produção enzimática foram obtidos após 48 e 72h de fermentação na região dos pontos centrais do delineamento experimental, onde a umidade inicial foi de 50%, a temperatura de incubação de 30°C e a quantidade de farelo de trigo incorporada à farinha de penas foi de 15%, condição em que a produção foi superior 300 U/g para protease, superior a 100 U/g para lipase, em torno de 80 U/g para fitase e próxima a 10 U/g para queratinase.

O estudo também levantou a possibilidade do uso da farinha de penas e sangue como substrato alternativo para produção e concentração de enzimas para usos diversos, inclusive a adição em ração de frangos.

Após a concentração dos extratos enzimáticos, as maiores atividades enzimáticas foram obtidas para as proteases (superiores a 5000 U/g) nas condições de pH de 5,5 e temperatura de 50°C, para as lipases (valores superiores a 2000 U/g) nas condições de pH de 2,0 a 3,0 e temperaturas acima de 50°C, para fitases os resultados não apresentaram um modelo capaz de explicar de forma satisfatória as melhores condições, mas o valor máximo (superior a 4800 U/g) foi obtido no ensaio realizado em pH 3,0 e temperatura 60,6°C, e para queratinases os resultados também não apresentaram um modelo capaz de explicar de forma satisfatória as melhores condições, mas os maiores valores (próximos a 400 U/g) foram obtidos nos ensaios realizados em pH 3,0 e 8,0 na temperatura de 60,6°C.

O estudo não conseguiu evidenciar a melhoria da digestibilidade da farinha de penas, uma vez que não houve diferença significativa entre os valores de proteína bruta e de digestibilidade em pepsina antes e após a fermentação. Porém, este resultado pode não ser limitante para a utilização da farinha fermentada, uma vez que a relação dos resultados de digestibilidade in vitro podem não ser confirmados com os resultados in vivo.

Perspectivas de trabalhos futuros

- Avaliar as possíveis atividades biológicas dos componentes resultantes da fermentação semissólida de farinha de penas e sangue por *A. niger*, tais como: atividade antioxidante, propriedades probióticas e antimicrobianas (principalmente, em relação a bactérias do gênero *Salmonella*);
- Realizar um estudo mais aprofundado de caracterização da matriz nutricional da farinha de penas fermentada, com sua composição físico-química, com cálculo de energia metabolizável e com seu aminograma (concentrações de cada aminoácido) e seus respectivos coeficientes de digestibilidade, possibilitando os cálculos para o uso em formulações de ração;
- Avaliar as características de estabilidade térmica das enzimas produzidas frente aos processos de peletização existentes na produção de rações;
- Realizar estudo in vivo com adição da farinha fermentada ou a adição das enzimas produzidas na ração para confirmar a melhoria das características nutricionais da farinha de penas e os benefícios no desempenho de crescimento e na saúde das aves;
- Comparar o desempenho de outros substratos para a suplementação da farinha de pena (outras fontes de carbono, de nitrogênio, de fosfatos inorgânicos, de surfactantes e de metais) e/ou outros micro-organismos na produção de enzimas e na digestibilidade proteica da farinha de penas.

Referências Bibliográficas

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal - Relatório Anual 2016.

ABRA - Associação Brasileira de Reciclagem Animal - II Diagnóstico da Indústria Brasileira Reciclagem Animal, 2016.

ADEBEYI, O.A., OLOGHOHO, A.D., ADU, O.A., OLASEHINDE, T.O.; Evaluation of the nutritional potentials of physically treated cowpea seed hulls in poultry feed. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, Vol. 22, p. 232-239, 2010.

ADEOLA, O. & COWIESON, A.J.; Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. **Journal of Animal Science**, Vol. 89: p. 3189–3218, 2011.

ADEREMI, F.A., NWORGU, F.C., Nutritional status of cassava peels and root sieviate biodegraded with *Aspergillus niger*. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, Vol. 2, p. 308–311, 2007.

AEHLE, W. Enzymes in Industry – production and applications, 3rd ed., **Wiley-VCH Verlag**, 2007.

AL-MUSALLAN, A.A., AL-GHARABALLY, D.H., VADAKKANACHERIL, N., Biodegradation of keratin in mineral-based feather medium by thermophilic strains of a new *Coprinopsis* sp. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Vol. 79, p. 42-48, 2013.

ANGAJALA, G., PAVAN, P., SUBASHINI, R. Lipases: an overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Vol. 7, p. 257-270, 2016.

ANUSHA, N.C., HIRZUN, M.Y., UMIKALSOM, Md.S, LING, T.C., ARIFF, A.B., comparative study on lipase production using solid state and submerged fermentation systems by several fungal strains and the predicted molecular characteristics, **Minerva Biotechnologica** Vol. 29, n. 2, p. 53-61, 2017.

AZEREDO, L.A.I., LIMA, M.B., COELHO, R.R.R., FREIRE, D.M.G., Thermophilic protease production by *Streptomyces* sp. 594 in submerged and solid-state fermentations using feather meal. **Journal of Applied Microbiology**, Vol. 100, p. 641-647, 2006.

BEDFORD, M.R., PARTRIDGE, G.G. (2nd Ed.) Enzymes in farm animal nutrition. **Oxford: CAB PUBLISHING**, 2011.

BERTSCH, A., COELLO, N., A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. **Bioresource Technology**; Vol. 96, p. 1703–1708, 2005.

BHARI, R., KAUR, M., SINGH, R.S., PANDEY, A., LARROCHE, C., Bioconversion of chicken feathers by *Bacillus aerius* NSMk2: A potential approach in poultry waste management. **Bioresource Technology**, Vol. 3, p. 224–230, 2018.

BHAVSAR, K., BUDDHIWANT, P., SONI, S. K., DEPAN, D., SARKAR, S., KHIRE, J. M. Phytase isozymes from *Aspergillus niger* NCIM 563 under solid state fermentation: biochemical characterization and their correlation with submerged phytases. **Process Biochemistry**, Vol. 48, p. 1618–1625, 2013.

BHAVSAR, K., KUMAR, V.R., KHIRE, J.M., High level phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 in solid state culture: response surface optimization, up- scaling, and its partial characterization. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Vol. 38, p. 1407-1417, 2011.

BOLING, S.D. DOUGLAS, M.W. JOHNSON, M.L. et al. The effects of dietary available phosphorus levels and phytase on performance of young and older laying hens. **Poultry Science**. Vol. 79, p. 535- 538, 2000.

BOSE, A., PATHAN, S., PATHAK, K., KEHARIA, H, Keratinolytic Protease Production by *Bacillus amyloliquefaciens* 6B Using Feather Meal as Substrate and Application of Feather Hydrolysate as Organic Nitrogen Input for Agricultural Soil. **Waste and Biomass Valorization**, Vol. 5, p. 595–605, 2014.

BRANDELLI, A., DAROIT, D.J., RIFFEL, A., Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol. 85, p. 1735–1750, 2010.

BRANDELLI, A., SALA, L., KALIL, S.J., Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. **Food Research International** Vol 73, p. 3–12, 2015.

CAO, F. L., ZHANG, X. H., YU, W. W., ZHAO, L. G., WANG, T., Effect of feeding fermented Ginkgo biloba leaves on growth performance, meat quality, and lipid metabolism in broilers. **Poultry Science**, Vol. 91, p. 1210–1221, 2012.

CAO L, TAN H, LIU Y, XUE X, ZHOU S, Characterization of a new keratinolytic *Trichoderma atroviride* strain F6 that completely degrades native chicken feather. **Letters in Applied Microbiology**, Vol. 46, p. 389–394, 2008.

CARVALHO, B. R., Avaliação de um componente enzimático em rações para frango de corte com diferentes idades, **Dissertação Mestrado Universidade Federal de Viçosa**, 2013.

CHARNEY, J., TOMARELLI, R.M.A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 170, p. 501-505, 1947.

CHAUD, L.C.S.; VAZ. P.V.; FELIPE, M.G. Considerações sobre a produção microbiana e aplicações de proteases. **Nucleus, Ituverava**, Vol. 4, n. 1-2, p. 87-97, 2007.

CHEN, K.L., KHO, W.L., YOU, S.H., YEH, R.H., TANG, S.W., HSIEH, C.W., Effects of *Bacillus subtilis* var. natto and *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermented feed on the enhanced growth performance of broilers. **Poultry Science**, Vol. 88, p. 309–315, 2009.

CHERYAN, M.; Phytic acid interactions in food systems. **Critical Reviews in Food Science and nutrition**, Vol. 13, p. 297-355, 1980.

CHOCT, M.; Enzymes for the feed industry: Past, present and future. **World's Poultry Science Journal**, Vol. 62, n. 1, p. 5-16, 2006.

CHUTMANOP, J., CHUICHULCHERM, S., CHISTI, Y., SIRINOPHAKUN, P.; Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates, **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Vol. 83, p. 1012–1018, 2008.

COMPÊNDIO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2009. Método 46.

COSTA, T.M., HERMANN, K.L., GARCIA-ROMAN, M., VALLE, R.C.S.C., TAVARES, L.B.B., Lipase production by *Aspergillus niger* grown in different agro-industrial wastes by solid-state fermentation, **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Vol. 34, n. 2, p. 419-427, 2017.

COULIBALY, A.; KOUAKOU, B., CHEN, J., Phytic acid in cereal grains: Structure, healthy or harmful ways to reduce phytic acid in cereal grains and their effects on nutritional quality. **American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology**, Vol.1, p. 1-22, 2011.

COURI, S., TERZI, S.C., PINTO, G.S., FREITAS, S.P., COSTA, A.C.A., Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, Vol. 36, p. 255-261, 2000.

DAVIS, J.G., MECCHI, E.P., LINEWEAVER, H., Processing of poultry by-products and their utilization in feeds **Processing of poultry by-products USDA, ARS**. Utilization research report No. 3, 1961.

DE CASTRO, R.J.S., NISHIDE, T.G., SATO, H.H., Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. Vol. 3, n. 4, p. 236-245, 2014.

DE CASTRO, R.J.S. & SATO, H.H., Enzyme Production by Solid State Fermentation: General Aspects and an Analysis of the Physicochemical Characteristics of Substrates for Agro-industrial Wastes Valorization, Waste and Biomass Valorization, Vol. 6, n.3, p. 1085-1093, 2015.

DEI, H.K., ROSE, S.P., MACKENZIE, A.M., AMAROWICZ, R., Growth performance of broiler chickens fed diets containing shea nut (*Vitellaria paradoxa*, Gaertn.) meal fermented with *Aspergillus niger*. **Poultry Science**, Vol. 87, p. 1773–1778, 2008.

DESSIMONI, G.V., Planos nutricionais com suplementação de protease em dietas de frangos de corte, **Tese (mestrado) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri**, 2011.

DESSIMONI, G.V., Avaliação de fitases microbianas em dietas de frangos de corte, **Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, 2015.

EAKSUREE, W., PRACHAYAKITTI, A., UPATHANPREECHA, T., TAHARNNKLAEW, R., NITISINPRASERT, S., KEAWSOMPONG, S.; In vitro and in vivo evaluation of protein quality of enzymatic treated feather meals, **SpringerPlus**, Vol. 5, n. 971, 2016.

ELKHALIL, E.A.I.; MANNER, K., BORRISS, R., SIMON, O., In vitro and in vivo characteristics of bacterial phytases and their efficacy in broiler chickens, **British Poultry Science** Vol 48, p. 64-70, 2007.

ENGBERG, R.M., HAMMERSHOJ, M., JOHANSEN, N.F., ABOUSEKKEN, M.S., STEENFELDT, S., JENSEN, B. B., Fermented feed for laying hens: effects on egg production, egg quality, plumage condition and composition and activity of the intestinal microflora. **British Poultry Science**, Vol. 50, p. 228–239, 2009.

EYNG, C., NUNES, R.V., ROSTAGNO, H.S., TEIXEIRA, L.F., GARCIA, C., NUNES, V., POZZA, P.C., Composição química e aminoácídica e coeficientes de digestibilidade verdadeira dos aminoácidos de farinhas de penas e sangue determinados em galos cecectomizados Chemical and amino acid composition and true digestibility coefficients of amino acids of feather and blood meals , determined in cecectomized cocks, **Revista Brasileira de Zootecnia**, Vol. 41, n. 1., p. 80–85, 2012.

FARAG, A.M, HASSAN, M.A., Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*, **Enzyme and Microbial Technology**, Vol. 34, p. 85–93, 2004.

FARINAS, C.S., LOYO, M.M., JUNIOR, A.B., TARDIOLI, P.W., NETO, V.B., COURI, S., Finding stable cellulase and xylanase: evaluation of the synergistic effect of pH and temperature. **New Biotechnology**, Vol. 27, p. 810-815, 2010.

FONTOURA, R., DAROIT, D.J., CORREAL, P.F., MEIRA, S.M.M., MOSQUERA, M., BRANDELLI, A., Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-I converting enzyme- and dipeptidyl peptidase-IV- inhibitory activities, **New Biotechnology**, Vol. 31, n. 5, p. 506-513, 2014.

GARCIA, E.R.M., MURAKAMI, A.E., BRANCO, A.F., FURLAN, A.C., MOREIRA, I., Efeito da Suplementação Enzimática em Rações com Farelo de Soja e Soja Integral Extrusada sobre a Digestibilidade de Nutrientes, o Fluxo de Nutrientes na Digesta Ileal e o Desempenho de Frangos, **Revista Brasileira de Zootecnia**, Vol. 29, n. 5, p. 1414-1426, 2000.

GAUTHIER, R. Intestinal health, the key to productivity: the case of organic acids. **Em: CONVENCION ANECA-WPDC. Anais. Puerto Vallarta. WPDC**, p. 1-14, 2002.

GEGECKAS, A., SIMKUTE, A., GUDIUKAITE, R., CITAVICIUS, D.J., Characterization and application of keratinolytic paptidases from *Bacillus* spp., **International Journal of Biological Macromolecules**, Vol. 113, p. 1206–1213, 2018.

GHAZI, S., ROOKE, J.A., GALBRAITH, H., BEDFORD, M.R. The potential for the improvement of the nutritive value of soya-bean meal by different proteases in broiler chicks and broiler cockerels. **British Poultry Science**. Vol. 43, p. 70–77, 2002.

GOPINATH, S.C., ANBU, P., LAKSHMIPRIYA, T., TANG, T.H., CHEN, Y., HASHIM, U., Biotechnological aspects and perspective of microbial keratinase production. **BioMed Research International - 2015**; 2015.

GRAZZIOTIN, A., PIMENTAL, F.A., SANGALI, S., JONG, E.V., BRANDELLI, A, Production of feather protein hydrolysate by keratinolytic bacterium *Vibrio sp.* kr2, **Bioresource Technology**, Vol. 98, p. 3172–3175, 2007.

GUNASHREE, B. S., VENKATESWARAN, G., Effect of different cultural conditions for phytase production by *Aspergillus niger* CFR 335 in submerged and solid-state fermentations, **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Vol. 35, p. 1587–1596, 2008.

GUPTA, R., RAMNANI, P., Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol. 70, p. 21–33, 2006.

HAMICHE, S., MECHRI, S., KHELOUIA, L., ANNANE, R., EL HATTAB, M., BADIS, A., JAOUADI, B., Purification and biochemical characterization of two keratinases from *Bacillus amyloliquefaciens* S13 isolated from marine brown alga *Zonaria tournefortii* with potential keratin-biodegradation and hide-unhairing activities, **International Journal of Biological Macromolecules**, Vol. 122, p. 758–769, 2019.

HEINOHEN, J.K., LATHI, R.J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. **Analytical Biochemistry**, Vol. 113, p. 313–317, 1981.

HONG, K.J., LEE, C.H., KIM, S.W., *Aspergillus oryzae* GB-107 fermentation improves nutritional quality of food soybeans and feed soybean meals. **Journal of Medicinal Food**, Vol. 7, p. 430–435, 2004.

HUO, G.C., FOWLER, V.R., INBORN, J., BEDFORD, M.R. The use of enzymes to denature antinutritive factors in soybean. In: **2nd Workshop on ANFs in Legume Seed, Wageningen, the Netherlands**, paper 60, 1993.

IGBASAN, F.A.; MÄNNER, K; MIKSCH, G.; BORRIS R.; FAROUK, A.; SIMONE, O. Comparative studies on the in vitro properties of phytases from various microbial origins, **Archiv für Tierernaehrung**, Vol. 53, p. 353-373, 2000.

JAZI, V., BOLDAJI, F., DASTAR, B., HASHEMI, S. R., ASHAYERIZADEH, A. Effects of fermented cottonseed meal on the growth performance, gastrointestinal microflora population and small intestinal morphology in broiler chickens. **British Poultry Science**, Vol. 58, n. 4, p. 402-408, 2017.

KOCHER, A., CHOCT, M., ROSS, G. Effects of enzyme combinations on apparent metabolizable energy of corn–soybean meal-based diets in broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, Vol. 12, p. 275-283, 2003.

LATSHAW, D., MUSHARA, N., RETRUM, R., Processing of feather meal to maximize its nutritional value for poultry, **Animal Feed Science and Technology**, Vol. 47, p. 179-188, 1994.

LEE, G.G., FERKET, P.R., SHIH, J.C.H., Improvement of feather digestibility by bacterial keratinase as a feed additive. **FASEB Journal**, Vol. 59, p. 1312, 1991.

LEMES, A.C., ALVARES, G.T., EGEA, M.B., BRANDELLI, A., KALIL, S.J., Simultaneous production of proteases and antioxidant compounds from agro-industrial by-products, **Bioresource Technology**, Vol. 222, p. 210–216, 2016.

LOPES, F.C., DEDAVID e SILVA, L.A., TICHOTA, D.M., DAROIT, D.J., VELHO, R.V., PEREIRA, J.Q., CORREA, A.P.F., BRANDELLI, A., Production of proteolytic enzymes by a keratin-degrading *Aspergillus niger*. **Enzyme Research**, 487093, 2011.

MACIEL, J.L., WERLANG, P.O., DAROIT, D.J., BRANDELLI, A., Characterization of Protein-Rich Hydrolysates Produced Through Microbial Conversion of Waste Feathers, **Waste Biomass Valor**, Vol. 8, p. 1177–1186, 2017.

MAHADIK, N.D., PUNTAMBEKAR, U.S., BASTAWDE, K.B., KHIRE, J.M., GOKHALE, D.V., Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation, **Process Biochemistry**, Vol. 38, p. 715-721, 2002.

MARQUARDT, R.R.; et al. Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. **Animal Feed Science Technology**. vol.60, p. 321 – 330, 1996.

MATIAS, C.F.Q.; ROCHA, J.S.R.; POMPEU, M.A.; BAIÃO, R.C.; BAIÃO, N.C.; LARA, L.J.C; CLIMACO, W.L.S.; PEREIRA, L.F.P; CALDAS, E.O.; TEIXEIRA, M.P.F; CARDEAL, P.C.; Efeito da protease sobre o coeficiente de metabolizabilidade dos nutrientes em frangos de corte; **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Vol.67, n. 2, p. 492-498, 2015.

MAZOTTO, A.M.; COURI, S.; DAMASOD, M.C.T., VERMELHO, A.B.; Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation, **International Biodeterioration & Biodegradation**, Vol. 85, p. 189-195, 2013.

MITIDIERI, S., MARTINELLI, A.H.S., SCHRANK, A., VAINSTEIN, M.H., Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: a comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, Vol. 97, p. 1217-1224, 2006.

MOREAU, J., BOUISSON, M., SAINT-MARC-GIRARDIN, MF, PIGNAL F, BOMMELAER G, RIBET A.; Comparison of fungal lipase and pancreatic lipase in exocrine pancreatic insufficiency in man. Study of their in vitro properties and intraduodenal bioavailability. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, Vol. 12, p. 787–792, 1988.

MORYA, V.K., YADAV, S., KIM, E., YADAV, D., In silico characterization of alkaline proteases from different species of *Aspergillus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Vol. 166, p. 243-257, 2012.

MUNIR, K. & MAQSOOD, S., A review on role of exogenous enzyme supplementation in poultry production, **Emirates Journal of Food and Agriculture**, Vol. 25, n. 1, p. 66-80, 2013.

MURAI, A., KOBAYASHI, T., OKADA, T., OKUMURA, J., Improvement of growth and nutritive value in chicks with non-genetically modified phytase product from *Aspergillus niger*, **British Poultry Science**, Vol. 43, p. 687–695, 2002.

NAJI, S.A.H., AL-ZAMILI, I.F.B., AL-GHARAWI, J.K.M., The effect of wetting and fermentation on the intestinal flora, humoral and cellular immunity of broiler chicks. **International Journal of Advanced Research**, Vol. 3, p. 87–94, 2015.

NIBA, A.T., BEAL, J.D., KUDI, A. C., BROOKS, P.H., Bacterial fermentation in the gastrointestinal tract of non – ruminants: influence of fermented feeds and fermentable carbohydrates. **Tropical Animal Health and Production**, Vol. 41, p. 1393–1407, 2009.

NOVELLI, P.K., BARROS, M.M, PEZZATO, L.E., ARAUJO, E.P., BOTELHO, R.M., FLEURI, L.F., Enzymes produced by agro-industrial co-products enhance digestible values for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): A significant animal feeding alternative, **Aquaculture**, Vol. 481, p. 1–7, 2017.

ODETALLAH, N.H.; WANG, J.J., GARLICH, J.D., SHIH, J.C.H. Keratinase in starter diets improves growth of broiler chicks. **Poultry Science**, Vol.82, n. 4, p. 664-670, 2003.

ODETALLAH, N.H.; WANG, J.J., GARLICH, J.D., SHIH, J.C.H., Versazyme supplementation of broiler diets improves market growth performance. **Poultry Science**, Vol. 84, p. 858–864, 2005

OLIVEIRA, C.T., PELLEZ, L., PEREIRA, J.Q., BRANDELLI, A., DAROIT, D.J., Screening of Bacteria for Protease Production and Feather Degradation, **Waste and Biomass Valorization**, Vol. 7, p. 447–453, 2016.

OLUKOSI, O.A.; COWIESON, A.J.; ADEOLA, O. Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase, and protease or phytase individually or in combination in broilers. **Poultry Science**, Vol. 86, n. 1, p. 77-86, 2007.

PACHECO, G.F.E.; PEZZALI, J.G., KESSLER, A.M., TREVIZAN, L.; Inclusion of exogenous enzymes to feathers during processing on the digestible energy content of feather meal for adult dogs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 45, n. 6, p. 288-294, 2016.

PANDEY, A., SOCCOL, C.R., MITCHELL, D.; New developments in solid state fermentation. I Processes and products. **Process Biochemistry**, Vol. 35, p. 1153–1169, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Vol. 13, n. 2, p. 81-84, 2003.

PARIZA, M.W., COOK, M.; Determining the safety of enzymes used in animal feed. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Vol. 56, p. 332–342, 2010.

PARK, G.T., SON, H.J., Keratinolytic activity of *Bacillus megaterium* F7-1, a feather-degrading mesophilic bacterium, **Microbiological Research**, Vol. 164, p. 478-485, 2009.

PEDERSEN, M.B.; YU, S.; PLUMSTEAD, P.; DALSGAARD, S.; Comparison of four feed proteases for improvement of nutritive value of poultry feather meal. **Journal of Animal Science**, v. 90, p. 350-352, 2012.

PRAKASH, P., JAYALAKSHMI, S.K., SREERAMULU, K., Production of Keratinase by Free and Immobilized Cells of *Bacillus halodurans* Strain PPKS-2: Partial Characterization and Its Application in Feather Degradation and Dehairing of the Goat Skin, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Vol. 160, p. 1909–1920, 2010.

PUGH, R. The scope for enzymes in commercial feed formulations. In: **BIOTECHNOLOGY IN FEED INDUSTRY, 9, Nottingham**. Proceedings...Nottingham: Nottingham University Press, p.369-372, 1993.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L. et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa, MG: UFV – Imprensa Universitária, 186p, 2005

SALEH, A.A.; EID, Y.Z.; EBEID, T.A.; KAMIZONO, T.; OHTSUKA, A.; HAYASHI, K.; Effects of Feeding *Aspergillus Awamori* and *Aspergillus Niger* on Growth performance and meat quality in Broiler Chickens; **Journal of Poultry Science**, Vol. 48, p. 201-206, 2011.

SALES, M.R., CAVALCANTI, M.T.H., FILHO, J.L.L., MOTTA, C.M.S., PORTO, A.L.F., Utilização de penas de galinha para produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius*, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Vol.43, n.2, p.285-288, 2008.

SANTOS, R.C.A., ARAUJO, K.B., SOARES, C.M.F., AQUINO, L.C.L., Evaluation of temperature and moisture response surface on the lipase from pumpkin seeds fermentation using *Aspergillus niger*, **Acta Scientiarum Technology**, Vol. 34, n. 3, p. 255-260, 2012.

SAHOO, D.K., DAS, A., THATOI, H., MONDAL, K.C., MOHAPATRA, P.K., Keratinase production and biodegradation of whole chicken feather keratin by a newly isolated bacterium under submerged fermentation, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Vol. 167, n. 5, p. 1040-1051, 2012.

SCAPIM, M.R.S., M., LOURES, E.G., ROSTAGNO, H., CECON, R., SCAPIM, C.A., Avaliação nutricional da farinha de penas e de sangue para frangos de corte submetida a

diferentes tratamentos térmicos, **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Vol. 25, n. 1, p. 91–98, 2003.

SCHEUERMANN, G.N.; ROSA, P.S.; BELLAVER, C. Farinhas de origem animal: vantagens e limitações do seu uso na alimentação de monogástricos. In: **SIMPÓSIO CATARINENSE DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2007. Chapecó**. Anais. Chapecó: UDESC, p.17, 2007.

SCHLEMMER, U., JANY, K.D., BERK, A., SCHULZ, E., RECHKEMMER, G., Degradation of phytate in the gut of pigs - pathway of gastrointestinal inositol phosphate hydrolysis and enzymes involved. **Archives of Animal Nutrition**, Vol. 55, p. 255–280, 2001.

SCHUSTER, E., DUNN-COLEMAN, N., FRISVAD, J.C., VAN DIJCK, P.W., On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol. 59, p. 426–435, 2002.

SELLE, P. H. & RAVINDRAN V.; Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, vol. 135, p. 1-41. 2007.

SEKAR, V., KANNAN, M., GENESAN, R., DHEEBA, B., SIVAKUMAR, N., KANNAN, K., Isolation and Screening of Keratinolytic Bacteria from Feather Dumping Soil in and Around Cuddalore and Villupuram, Tamil Nadu, **Proceedings of the National Academy of Sciences India - Section B - Biological Sciences**, Vol. 86, n. 3, p. 567-575, 2016.

SHIH, J.C.H., Biodegradation and Utilization of Feather Keratin, **Proceedings of 1999 Animal Waste Management Symposium, North Carolina State University**, p. 165–171, 1999.

SILVA, E.B., OHARA, A., FERNANDES, C.M., BARBOSA, P.P.M., MACEDO, G.A. Screening of filamentous fungi from Brazilian rainforests for enzyme production. **African Journal of Microbiology Research**, Vol. 9, n. 5, p. 332-342, 2015.

SIVAKUMAR, N. & RAVEENDRAN, S., Keratin degradation by bacteria and fungi isolated from a poultry farm and plumage, **British Poultry Science**, Vol. 56, n. 2, p. 210-217, 2015.

SON, H.J., PARK, H.C., KIM, H.S., LEE, C.Y., Nutritional regulation of keratinolytic activity in *Bacillus pumilis*, **Biotechnology Letters**, Vol 30, p. 461–465, 2008.

SU, C., GONG, J.S., ZHANG, R.X., TAO, L.Y., DOU, W.F., ZHANG, D.D., LI, H., LU, Z.M., XU, Z.H., SHI, J.S., A novel alkaline surfactant-stable keratinase with

superior feather-degrading potential based on library screening strategy, **International Journal of Biological Macromolecules**, Vol. 95, p. 404–411, 2017.

TANNOCK, G.W., Molecular assessment of intestinal micro-flora. **American Journal of Clinical Nutrition**, Vol. 73, p. 410–414, 2001.

TIWARY, E. & GUPTA, R., Medium optimization for a novel 58 kDa dimeric keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15: Biochemical characterization and application in feather degradation and dehairing of hides, **Bioresource Technology** Vol. 101, p. 6103–6110, 2010.

WANG J.J.; GARLICH, J.D.; SHIH, J.C.H. Beneficial effects of versazyme, a keratinase feed additive, on body weight, feed conversion, and breast yield of broilers chickens. **Journal of Applied Poultry Research**. Vol.15, p. 544-550, 2006.

WANG, Y., YAN, J., ZHANG, X. & HAN, B., Tolerance properties and growth performance assessment of *Yarrowia lipolytic* lipase in broilers, **Journal of Applied Animal Research**, 2017.

WEST, M.L., CORZO, A., DOZIER, W.A., BLAIR, M.E., KIDD, M.T.; Assessment of dietary Rovabio excel in practical United States broiler diets. **The Journal of Applied Poultry Research**, Vol 16, p. 313–321, 2007.

WU, Q.J., WANG, Z.B., WANG, G.Y., LI, Y.X., QI, Y.X., Effects of feed supplemented with fermented pine needles (*Pinus ponderosa*) on growth performance and antioxidant status in broilers, **Poultry Science**, Vol. 94, p. 1138–1144, 2015.

ZHANG, Y., YANG, R., ZHAO, W., Improving Digestibility of Feather Meal by Steam Flash Explosion, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Vol. 62, p. 2745–2751, 2014.

ZHANG, X.H., SUN, Z.Y., CAO, F.L., AHMAD, H., YANG, X.H., ZHAO, L.G., WANG, T., Effects of dietary supplementation with fermented ginkgo leaves on antioxidant capacity, intestinal morphology and microbial ecology in broiler chicks, **British Poultry Science**, Vol. 56, N. 3, p. 370–380, 2015.

ZHAO, G., DING, L. L., PAN, Z. H., KONG, D. H., HADIATULLAH, H., FAN, Z. C., Proteinase and glycoside hydrolase production is enhanced in solid-state fermentation by manipulating the carbon and nitrogen fluxes in *Aspergillus oryzae*. **Food Chemistry**, Vol. 271, p. 606–613, 2019.

ZENTLER-MUNRO P.L., ASSOULI, B.A., BALASUBRAMANIAN, K., CORNELL, S., BENOLIEL, D., NORTHFIELD T.C., HODSON, M.E. Therapeutic potential and clinical efficacy of acid-resistant fungal lipase in the treatment of pancreatic steatorrhoea due to cystic fibrosis. **Pancreas**. Vol. 7, p. 311–319, 1992.

ANEXO A

As Tabelas 28 e 29 apresentam os coeficientes de regressão e os efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,10$) para a produção de protease após 72 e 96 horas de fermentação respectivamente.

Tabela 28. Coeficientes de regressão do DCCR 2³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de *A. niger* LBA02 e produção de protease após 72h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.

Fator	Coeficientes	Erro Padrão	t (7)	p-Valor
Média	27,65	38,37	0,72	0,495
(1)Umidade (%) (L)	-28,40	18,02	-1,58	0,159
Umidade (%) (Q)*	51,22	19,83	2,58	0,036
(2)Temperatura (°C) (L)*	-54,49	18,02	-3,02	0,019
Temperatura (°C) (Q)	12,22	19,83	0,62	0,557
(3)Farelo de Trigo (%) (L)	-20,71	18,02	-1,15	0,288
Farelo de Trigo (%) (Q)*	42,52	19,83	2,14	0,069
1L x 2L	-18,00	23,54	-0,76	0,469
1L x 3L	12,22	23,54	0,52	0,620
2L x 3L	-8,34	23,54	-0,35	0,734

*Termos significativos (p-valor). L = linear; Q = quadrático; $R^2 = 73\%$

Tabela 29. Coeficientes de regressão do DCCR 2³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de *A. niger* LBA02 e produção de protease após 96h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.

Fator	Coeficientes	Erro Padrão	t (7)	p-Valor
Média*	35,64	19,19	1,86	0,106
(1)Umidade (%) (L)*	-38,77	9,01	-4,30	0,004
Umidade (%) (Q)*	35,40	9,92	3,57	0,009
(2)Temperatura (°C) (L)*	-45,25	9,01	-5,02	0,001
Temperatura (°C) (Q)*	26,08	9,92	2,63	0,034
(3)Farelo de Trigo (%) (L)	2,30	9,01	0,25	0,806
Farelo de Trigo (%) (Q)	4,47	9,92	0,45	0,666
1L x 2L*	28,85	11,78	2,45	0,044
1L x 3L	-12,45	11,78	-1,06	0,326
2L x 3L	-7,70	11,78	-0,65	0,534

*Termos significativos (p-valor). L = linear; Q = quadrático; $R^2 = 88\%$

ANEXO B

As tabelas 30 e 31 apresentam os coeficientes de regressão e os efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,10$) para a produção de lipase após 72 e 96 horas de fermentação respectivamente.

Tabela 30. Coeficientes de regressão do DCCR 2³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de *A. niger* LBA02 e produção de lipase após 72h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.

Fator	Coeficientes	Erro Padrão	t (7)	p-Valor
Média	72,30	10,02	7,22	<0,001
(1)Umidade (%) (L)	2,75	4,71	0,58	0,578
Umidade (%) (Q)	-6,90	5,18	-1,33	0,225
(2)Temperatura (°C) (L)	-4,52	4,71	-0,96	0,369
Temperatura (°C) (Q)*	-10,63	5,18	-2,05	0,079
(3)Farelo de Trigo (%) (L)	-5,46	4,71	-1,16	0,284
Farelo de Trigo (%) (Q)	2,22	5,18	0,43	0,681
1L x 2L	-3,41	6,15	-0,55	0,596
1L x 3L	2,01	6,15	0,33	0,753
2L x 3L	3,66	6,15	0,59	0,571

*Termos significativos (p-valor). L = linear; Q = quadrático; $R^2 = 58\%$

Tabela 31. Coeficientes de regressão do DCCR 2³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de *A. niger* LBA02 e produção de lipase após 96h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.

Fator	Coeficientes	Erro Padrão	t (7)	p-Valor
Média	87,14	6,77	12,88	<0,001
(1)Umidade (%) (L)	3,33	3,18	1,05	0,330
Umidade (%) (Q)	-6,48	3,50	-1,85	0,106
(2)Temperatura (°C) (L)*	-19,18	3,18	-6,03	<0,001
Temperatura (°C) (Q)	-3,36	3,50	-0,96	0,368
(3)Farelo de Trigo (%) (L)*	-8,10	3,18	-2,55	0,038
Farelo de Trigo (%) (Q)	1,08	3,50	0,31	0,766
1L x 2L	-1,54	4,15	-0,37	0,723
1L x 3L	-1,93	4,15	-0,46	0,657
2L x 3L	3,60	4,15	0,87	0,415

*Termos significativos (p-valor). L = linear; Q = quadrático; $R^2 = 76\%$

ANEXO C

As tabelas 32 e 33 apresentam os coeficientes de regressão e os efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,10$) para a produção de fitase após 48 e 96 horas de fermentação respectivamente.

Tabela 32. Coeficientes de regressão do DCCR 2³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de *A. niger* LBA02 e produção de fitase após 48h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.

Fator	Coeficientes	Erro Padrão	t (7)	p-Valor
Média	59,08	13,40	4,41	0,003
(1)Umidade (%) (L)	-5,03	6,29	-0,80	0,450
Umidade (%) (Q)	1,30	6,92	0,19	0,856
(2)Temperatura (°C) (L)	6,05	6,29	0,96	0,368
Temperatura (°C) (Q)	2,83	6,92	0,41	0,695
(3)Farelo de Trigo (%) (L)	-1,94	6,29	-0,31	0,767
Farelo de Trigo (%) (Q)	-3,50	6,92	-0,51	0,629
1L x 2L	-7,79	8,22	-0,95	0,375
1L x 3L	-6,48	8,22	-0,79	0,457
2L x 3L	5,95	8,22	0,72	0,493

*Termos significativos (p-valor). L = linear; Q = quadrático; $R^2 = 38\%$

Tabela 33. Coeficientes de regressão do DCCR 2³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de *A. niger* LBA02 e produção de fitase após 96h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.

Fator	Coeficientes	Erro Padrão	t (7)	p-Valor
Média	90,03	10,24	8,79	<0,001
(1)Umidade (%) (L)	-0,31	4,81	-0,06	0,951
Umidade (%) (Q)	-1,38	5,29	-0,26	0,803
(2)Temperatura (°C) (L)	-1,87	4,81	-0,39	0,709
Temperatura (°C) (Q)	-8,48	5,29	-1,60	0,153
(3)Farelo de Trigo (%) (L)	4,15	4,81	0,86	0,417
Farelo de Trigo (%) (Q)*	-12,30	5,29	-2,32	0,053
1L x 2L	7,01	6,29	1,11	0,302
1L x 3L	2,64	6,29	0,42	0,687
2L x 3L	5,05	6,29	0,80	0,448

*Termos significativos (p-valor). L = linear; Q = quadrático; $R^2 = 58\%$

ANEXO D

As tabelas 34, 35 e 36 apresentam os coeficientes de regressão e os efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,10$) para a produção de queratinase após 48, 72 e 96 horas de fermentação respectivamente.

Tabela 34. Coeficientes de regressão do DCCR 2³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de *A. niger* LBA02 e produção de queratinase após 48h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.

Fator	Coeficientes	Erro Padrão	t (7)	p-Valor
Média	12,35	3,36	3,68	0,010
(1)Umidade (%) (L)	-1,97	1,58	-1,25	0,250
Umidade (%) (Q)	-0,24	1,74	-0,14	0,900
(2)Temperatura (°C) (L)	-0,66	1,58	-0,42	0,690
Temperatura (°C) (Q)	-1,57	1,74	-0,90	0,400
(3)Farelo de Trigo (%) (L)	-0,07	1,58	-0,04	0,970
Farelo de Trigo (%) (Q)	-2,74	1,74	-1,58	0,160
1L x 2L	2,93	2,06	1,42	0,200
1L x 3L	0,84	2,06	0,41	0,700
2L x 3L	-0,64	2,06	-0,31	0,770

*Termos significativos (p-valor). L = linear; Q = quadrático; $R^2 = 43\%$

Tabela 35. Coeficientes de regressão do DCCR 2³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de *A. niger* LBA02 e produção de queratinase após 72h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.

Fator	Coeficientes	Erro Padrão	t (7)	p-Valor
Média	14,01	4,36	3,21	0,010
(1)Umidade (%) (L)	-0,19	2,05	-0,09	0,930
Umidade (%) (Q)	-1,38	2,25	-0,61	0,560
(2)Temperatura (°C) (L)	-3,73	2,05	-1,82	0,110
Temperatura (°C) (Q)	-1,68	2,25	-0,75	0,480
(3)Farelo de Trigo (%) (L)	-1,21	2,05	-0,59	0,570
Farelo de Trigo (%) (Q)	-2,35	2,25	-1,04	0,330
1L x 2L	-0,86	2,68	-0,32	0,760
1L x 3L	-3,06	2,68	-1,14	0,290
2L x 3L	5,73	2,68	2,14	0,070

*Termos significativos (p-valor). L = linear; Q = quadrático; $R^2 = 59\%$

Tabela 36. Coeficientes de regressão do DCCR 2³ para determinação das condições mais adequadas de cultivo de *A. niger* LBA02 e produção de protease após 96h de fermentação sólida utilizando farinha de penas e farelo de trigo como substrato.

Fator	Coeficientes	Erro Padrão	t (7)	p-Valor
Média	12,19	2,36	5,16	<0,001
(1)Umidade (%) (L)	-0,31	1,11	-0,28	0,790
Umidade (%) (Q)*	-2,71	1,22	-2,22	0,060
(2)Temperatura (°C) (L)*	-2,64	1,11	-2,38	0,050
Temperatura (°C) (Q)	-1,73	1,22	-1,42	0,200
(3)Farelo de Trigo (%) (L)	0,81	1,11	0,73	0,490
Farelo de Trigo (%) (Q)*	-2,56	1,22	-2,10	0,070
1L x 2L	-0,04	1,45	-0,03	0,980
1L x 3L	-0,46	1,45	-0,32	0,760
2L x 3L	-1,02	1,45	-0,70	0,500

*Termos significativos (p-valor). L = linear; Q = quadrático; R² = 65%